UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

REJANE MARA FRIZZARIN

Desenvolvimento de procedimentos analíticos em fluxo explorando difusão gasosa ou extração em ponto nuvem. Aplicação a amostras de interesse agronômico e ambiental

> Piracicaba 2014

REJANE MARA FRIZZARIN

Desenvolvimento de procedimentos analíticos em fluxo explorando difusão gasosa ou extração em ponto nuvem.

Aplicação a amostras de interesse agronômico e ambiental

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

Piracicaba 2014 AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Frizzarin, Rejane Mara

Desenvolvimento de procedimentos analíticos em fluxo explorando difusão gasosa ou extração em ponto nuvem. Aplicação a amostras de interesse agronômico e ambiental / Rejane Mara Frizzarin; orientador Fábio Rodrigo Piovezani Rocha. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014. 164 f. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Análise em fluxo contínuo 2. Antimônio 3. Espectrofotometria 4. Ferro 5. Gases venenosos 6. Monitoramento ambiental 7. Química analítica instrumental 8. Quimiometria 9. Separação gás-líquido 10. Separação líquido-líquido I. Título

CDU (544.07 + 542.66) : 543.42

(...) "Sinto-me como aquele menino que recebeu uma bacia de jabuticaba...

As primeiras, ele chupou displicente, mas percebendo que faltam poucas, rói o caroço.

Já não tenho tempo para lidar com mediocridades.

Não quero estar em reuniões onde desfilam egos inflados.

Inquieto-me com invejosos tentando destruir quem eles admiram, cobiçando seus lugares, talentos e sorte.(...)

Já não tenho tempo para conversas intermináveis, para discutir assuntos inúteis sobre vidas alheias que nem fazem parte da minha. Já não tenho tempo para administrar melindres de pessoas, que apesar da idade cronológica, são imaturos.

Detesto fazer acareação de desafetos que brigaram pelo majestoso cargo de secretário geral do coral ou semelhante bobagem, seja ela qual for.

Meu tempo tornou-se escasso para debater rótulos, quero a essência, minha alma tem pressa...

Sem muitas jabuticabas na bacia, quero viver ao lado de gente humana, muito humana;

que sabe rir de seus tropeços,

não se encanta com triunfos,

não se considera eleita antes da hora,

não foge de sua mortalidade,

defende a dignidade dos marginalizados,

e deseja tão somente andar humildemente ao lado de Deus.

Caminhar perto de coisas e pessoas de verdade,

Desfrutar desse amor absolutamente sem fraudes, nunca será perda de tempo. O essencial faz a vida valer a pena. Basta o essencial!"

Ricardo Gondim (com adaptações)

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por me permitir viver tantas experiências maravilhosas.

À minha família maravilhosa por me apoiar em todos os momentos e decisões. Não tenho palavras para expressar tanta gratidão!

Ao Professor Fábio, amigo querido, que sempre esteve presente em momentos importantes em minha vida, ajudando a direcioná-la sempre para melhor. Suas observações são sempre muito sensatas e admiráveis!

Ao meu amor! Disseram que deveria esperar pelo melhor e que valeria a pena. Estavam completamente certos! Amo-te muito!...

Ao Professor Boaventura que me "aceitou de volta". Seu caráter é um exemplo a ser seguido. Quando "crescer", quero ser assim!

Ao Professor Jacintho por me permitir conhecer a área acadêmica. Com isso, descobri que sou apaixonada pela ciência!

Aos amigos queridos Professor Antônio e Luciana, que acompanharam uma boa etapa da minha vida. Sem vocês por perto, não teria conseguido!

Ao querido amigo Lindomar, "minha dose frequente de serotonina". Apesar de a amizade ser recente, não é menos importante. Trabalhar contigo é um presente maravilhoso.

Às queridas amigas Lidiane, Claudinéia e Camélia que são como anjos da guarda em minha vida.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pela oportunidade de desenvolver a Pós-Graduação.

Aos amigos que estiveram e estão no laboratório Diogo, Andréia, Alex, Carina, Andressa, Marcia e Renata. Gostei muito de compartilhar este período. Foram momentos memoráveis.

Aos amigos, técnicos e professores da Química Analítica: Ana Clara, Carla, Claudia, Diogo, Eliezer, Fátima, Felisberto, Gabriel, Gláucia, Manuel, Marcelo, Marcos, Milton, Sheila, Tatinha, Taciana, Ticiane, Tuanne, Valdemir, Prof. Chico Krug, Profa. Fernanda, Prof. Zagatto. Aos amigos da UIB Alba, Daniel, Edwin, Estevan, Fátima, Fernando, Irênio, Jessica, Laiana, Laura, Melissa, Miquel, Pew, Rogélio, Ruth, Sabrina, Toni.

Ao Professor Víctor Cerdà que prontamente me aceitou para o estágio no exterior e me acolheu deixando o ambiente de trabalho tão agradável.

Ao Professor Manolo por acompanhar o trabalho desenvolvido e sempre fazer sugestões apreciáveis.

Aos funcionários do CENA que ajudaram muito durante toda a etapa do doutorado.

À Capes pela concessão das bolsas de estudos e ao CNPq e FAPESP pelos recursos financeiros.

À banca examinadora pelas observações e sugestões.

À todos que acompanharam este período e que participaram de alguma forma da minha formação.

Sinceramente, muito obrigada!

Ouvi dizer: siga seu coração e portas

se abrirão onde só existiam paredes.

Não é que eles estavam completamente certos?

RESUMO

FRIZZARIN, R. M. Desenvolvimento de procedimentos analíticos em fluxo explorando difusão gasosa ou extração em ponto nuvem. Aplicação a amostras de interesse agronômico e ambiental. 2014. 164 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Procedimentos analíticos espectrofotométricos foram desenvolvidos empregando etapas de separação e pré-concentração em sistemas de análises em fluxo com multi-impulsão ou lab-insyringe, com aplicação a amostras de interesse agronômico (ferro em materiais vegetais e alimentos) e ambiental (cianeto dissociável em ácidos, ferro e antimônio em águas). A determinação de cianeto explorou a descoloração do complexo formado entre Cu(I) e ácido 2-2'biquinolino-4,4'-dicarboxílico (BQA) pela presença de CN⁻, após a separação de HCN por difusão gasosa. Espectrofotometria com longo caminho óptico foi empregada para aumentar a sensibilidade, com resposta linear entre 5 e 200 µg L⁻¹, limite de detecção, coeficiente de variação (n = 10) e frequência de amostragem de 2,0 μ g L⁻¹, 1,5% e 22 h⁻¹, respectivamente. O procedimento consumiu apenas 48 ng de Cu(II), 5,0 µg de ácido ascórbico e 0,9 µg de BQA por determinação e gerou 2,6 mL de efluente. Tiocianato, nitrito e sulfito não afetaram a determinação de cianeto e peróxido de hidrogênio evitou a interferência de sulfeto até 200 µg L⁻ ¹. Os resultados para as amostras de águas naturais foram concordantes com o procedimento fluorimétrico em fluxo com 95% de confiança. Novas estratégias foram propostas para a extração em ponto nuvem (EPN) em fluxo: (i) a fase rica em surfactante foi retida diretamente na cela de fluxo, evitando a diluição; (ii) microbombas solenoide foram exploradas para melhorar a mistura e modular a vazão na retenção e remoção da fase rica, evitando a eluição com solvente orgânico e (iii) o calor liberado e os sais fornecidos por uma reação de neutralização em linha foram explorados para indução do ponto nuvem, sem dispositivo externo de aquecimento. Estas inovações foram demonstradas pela determinação espectrofotométrica de ferro baseada no complexo com 1-(2-tiazolilazo)-2-naftol (TAN). Resposta linear foi observada entre 10 e 200 μ g L⁻¹, com limite de detecção, coeficiente de variação e frequência de amostragem de 5 μ g L⁻¹, 2,3% (n = 7) e 26 h^{-1} , respectivamente. O fator de enriquecimento foi de 8,9 com consumo apenas de 6 µg de TAN e 390 µg de Triton X-114 por determinação. Os resultados para amostras de águas foram concordantes com o procedimento de referência e os obtidos para digeridos de materiais de referência de alimentos concordaram com os valores certificados. A determinação espectrofotométrica de antimônio foi realizada explorando pela primeira vez a EPN em sistema *lab-in-syringe*. O complexo iodeto e antimônio forma um par iônico com H^{\star} , que pode ser extraído com Triton X-114. Planejamento fatorial demonstrou que as concentrações de ácido ascórbico, H₂SO₄ e Triton X-114, bem como as interações de segunda e de terceira ordem foram significativas (95% de confiança). Planejamento Box-Behnken foi aplicado para a identificação dos valores críticos. Robustez com 95% de confiança, resposta linear entre 5 e 50 μg L⁻¹, limite de detecção, coeficiente de variação (n = 5) e frequência de amostragem foram estimados em 1,8 μ g L⁻¹, 1,6% e 16 h⁻¹, respectivamente. Os resultados para amostras de águas naturais e medicamentos anti-leishmaniose foram concordantes com os obtidos por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HGFAAS) com 95% de confiança.

Palavras-chave: Análises em fluxo. Extração em ponto nuvem. Difusão gasosa. Espectrofotometria com longo caminho óptico. Multi-impulsão. *Lab-in-syringe*. Cianeto. Antimônio.

ABSTRACT

FRIZZARIN, R. M. Development of flow-based analytical procedures exploiting gas diffusion or cloud point extraction. Application to agronomic and environmental samples. 2014. 164 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Spectrophotometric analytical procedures were developed by exploiting separation and preconcentration steps in flow systems based on multi-pumping or *lab-in-syringe* approaches with application to agronomic (iron in plant materials and food) and environmental samples (acid dissociable cyanide, iron and antimony in waters). Cyanide determination exploited bleaching of the Cu(I)/2,2'-biquinoline 4,4'-dicarboxylic acid (BCA) complex by the analyte, after separation of HCN by gas diffusion. Long path length spectrophotometry was successfully exploited to increase sensitivity, thus achieving a linear response from 5 to 200 μ g L⁻¹, with detection limit, coefficient of variation (n = 10) and sampling rate of 2 μ g L⁻¹, 1.5% and 22 h⁻¹, respectively. Each determination consumed 48 ng of Cu(II), 5 µg of ascorbic acid and 0.9 µg of BCA. As high as 100 mg L⁻¹ thiocyanate, nitrite or sulfite did not affect cyanide determination and sample pretreatment with hydrogen peroxide avoided sulfide interference up to 200 μ g L⁻¹. The procedure is environmentally friendly and presented one of the lowest detection limits associated to high sampling rate. The results for freshwater samples agreed with those obtained with the flow-based fluorimetric procedure at the 95% confidence level. Novel strategies were proposed for on-line cloud point extraction (CPE): (i) the surfactant-rich phase was retained directly into the flow cell to avoid dilution prior to detection; (ii) solenoid micro-pumps were explored to improve mixing and for flow modulation in the retention and removal of the surfactant-rich phase, thus avoiding the elution step with organic solvents and (iii) the heat released and the salts provided by an on-line neutralization reaction were exploited to induce cloud point without an external heating device. These approaches were demonstrated for the spectrophotometric determination of iron based on complex formation with 1-(2-thiazolylazo)-2naphtol (TAN). A linear response was observed from 10 to 200 μ g L⁻¹, with detection limit, coefficient of variation, and sampling rate of 5 μ g L⁻¹, 2.3% (n = 7) and 26 h⁻¹, respectively. The enrichment factor was 8.9 and the procedure consumed only 6 µg of TAN and 390 µg of Triton X-114 per determination. The results for freshwater samples agreed with the reference procedure and those obtained for certified reference materials of food agreed with the certified values. Spectrophotometric determination of antimony was performed for the first time exploiting CPE in the lab-in-syringe system. The antimony/iodide complex forms an ion-pair with H^{\dagger} , which can be extracted with Triton X-114. Factorial design showed that the concentrations of ascorbic acid, H₂SO₄ and Triton X-114, as well as the second and third order interactions were significant (95% confidence). The Box-Behnken design was applied to identify the critical values. The system is robust with 95% confidence and a linear response was observed from 5 to 50 μ g L⁻¹, with detection limit, coefficient of variation (n = 5) and sampling rate of 1.8 μ g L⁻¹, 1.6% and 16 h⁻¹, respectively. The results for water samples and antileishmanial drugs agreed with those obtained by hydride generation atomic absorption spectrometry at the 95% confidence level.

Keywords: Flow analysis. Cloud point extraction. Gas diffusion. Multi-pumping. Long path lenght spectrophotometry. Lab-in-syringe. Cyanide. Antimony.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Representação esquemática do sistema lab-in-syringe	30
Figura 1.2 -	Esquema dos componentes usualmente empregados em uma	
	câmara de difusão gasosa modelo sanduíche	40
Figura 1.3 -	Esquema da transmissão da luz no guia de ondas	44
Figura 3.1 -	Sistema de análises em fluxo com multi-impulsão para a determinação de cianeto dissociável em ácidos	52
Figura 3.2 -	Espectros de absorção do complexo [Cu(BQA) ₂] ³⁻ antes e após reação com CN ⁻	54
Figura 3.3 -	Estudo cinético do produto da reação entre Cu(I) e BQA	55
Figura 3.4 -	Efeito da concentração de cobre sobre os sinais de referência e obtidos na presença de CN ⁻	58
Figura 3.5 -	Efeito da concentração de BQA sobre os sinais de referência e obtidos na presença de CN ⁻	59
Figura 3.6 -	Efeito da concentração de NH₄CH₃COO sobre os sinais de referência e obtidos na presença de CN ⁻	60
Figura 3.7 -	Efeito do pH da solução aceptora sobre os sinais de referência e obtidos na presença de CN ⁻	61
Figura 3.8 -	Diagrama de distribuição das espécies HCN e CN ⁻ em função do pH	62
Figura 3.9 -	Efeito da vazão sobre os sinais de referência e obtidos na presença de CN ⁻	64
Figura 3.10 -	Efeito do tipo de ácido na geração de HCN	65
Figura 3.11 -	Efeito do aceptor para fixação do HCN	66
Figura 3.12 -	Efeito da concentração de NH₄OH como aceptor de HCN	66
Figura 3.13 -	Efeito da fração volumétrica sobre os sinais de referência e obtidos	
Figura 3.14 -	na presença de CN ⁻ Efeito do número de ciclos de amostragem sobre os sinais de	67
	referência e obtidos na presença de CN	68
Figura 3.15 -	Sinais transientes e curva analítica para a determinação de CDA no	70
Figura 3.16 -	Efeito da concentração de sulfeto sobre o sinal de absorbância de	70
Figura 3.17 -	Efeito da adição de H_2O_2 sobre a interferência de sulfeto em	74
Figura 4.1 -	Sistema de análises em fluxo com multi-impulsão para extração em	85
Figura 4.2 -	Espectros de absorção do complexo Fe(II)-TAN e da solução branco	87
Figura 4.3 -	Efeito da temperatura sobre os sinais da solução de referência e do branco	88
Figura 4.4 -	Comparação entre algodão e membrana de poliéster como materiais filtrantes para a retenção da FRS na cela de medida	90
Figura 4.5 -	Respostas com e sem a adaptação de um tubo restritor na saída da cela de fluxo	91
Figura 4.6 -	Estratégia para a compensação de espalhamento de radiação com medidas espectrofotométricas em dois comprimentos de onda	92
Figura 4.7 -	Efeito do tempo de integração do espectrofotômetro multicanal nos	
Figura 4.8 -	sinais da solução de referência e do branco Efeito da frequência de pulsação sobre os sinais da solução de	93
-	referência e do branco	94

Figura 4.9 -	Efeito da concentração de Triton X-114 sobre os sinais da solução de referência e do branco	95
Figura 4.10 -	Efeito da concentração de TAN sobre os sinais da solução de	
	referência e do branco	96
Figura 4.11 -	Efeito da razão volumétrica amostra:reagente sobre os sinais da solução de referência e do branco	97
Figura 4.12 -	Ffeito do número de ciclos de amostragem sobre os sinais da	
- 3	solução de referência e do branco	98
Figure 4 12	Sinais transientos obtidos para soluçãos de referência de forre pa	50
Figura 4.15 -	EPN em fluxo	100
Figura 5.1 -	Sistema <i>lab-in-svringe</i> com EPN em linha para a determinação de	
	antimônio	114
Figura 5.2 -	Efeito da temperatura sobre as respostas da solução de referência e	
i igula J.2 -	do branco	110
	Efeite de adição de cois cobre as respectas de brance o de selveão	110
rigura 5.5 -	Eleito da adição de sais sobre as respostas do branco e da solução	110
		119
Figura 5.4 -	Grafico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial para	
	determinação de antimônio	123
Figura 5.5 -	Gráfico das médias marginais para os efeitos de interação entre as	
	variáveis (H ₂ SO ₄ x KI)	124
Figura 5.6 -	Gráfico das médias marginais para os efeitos de interação de	
	terceira ordem entre as variáveis (H ₂ SO ₄ x AA x Triton X-114)	125
Figura 5.7 -	Superfícies de resposta (KI x H_2SO_4); (Triton X-114 x H_2SO_4); (Triton X-	
•	114 x KI) e valores previstos x observados obtidos com o	
	planeiamento Box-Behnken	129
Figura 5.8 -	Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial para o teste de	
1.5414 5.0	robustez do procedimento otimizado	121
Figure F O	Sinais transiontas a sunya analítica obtidas com sistema lah in	101
rigula 2.2 -	Sinais transientes e cuiva analitica obtituos com Sistema <i>Iub-III-</i>	122
	syringe para EPN de antimonio em linna	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 -	Surfactantes mais empregados em Química Analítica	35
Tabela 3.1 -	Rotina de acionamento dos dispositivos para a determinação de	
	cianeto dissociável em ácidos	53
Tabela 3.2 -	Ordem de inserção de amostra e reagentes na zona de amostra	61
Tabela 3.3 -	Parâmetros otimizados para a determinação de cianeto dissociável	
	em ácidos	69
Tabela 3.4 -	Características analíticas de procedimentos em fluxo para a	
	determinação de cianeto em águas naturais ou residuais	72
Tabela 3.5 -	Recuperações de CDA em complexos metálicos	73
Tabela 3.6 -	Valores médios e incertezas para a determinação de CDA após	
	adição de cianeto em amostras de águas naturais	77
Tabela 4.1 -	Rotina de acionamento dos dispositivos para extração em ponto	
	nuvem em fluxo	86
Tabela 4.2 -	Parâmetros otimizados para extração em ponto nuvem em fluxo	99
Tabela 4.3 -	Figuras de mérito dos procedimentos para determinação de ferro	
	explorando pré-concentração do analito em batelada ou em linha	103
Tabela 4.4 -	Comparação de procedimentos analíticos em fluxo explorando	
	extração em ponto nuvem	104
Tabela 4.5 -	Valores médios e incertezas para a determinação de ferro total em	
	águas naturais empregando o procedimento com aquecimento	
	externo	106
Tabela 4.6 -	Valores médios e incertezas para a determinação de ferro em	
	materiais de referência certificados	107
Tabela 5.1 -	Rotina de operação do sistema <i>lab-in-syringe</i> para EPN em linha	
	para a determinação de antimónio	115
Tabela 5.2 -	Matriz experimental do planejamento fatorial completo	121
Tabela 5.3 -	Resultados da ANOVA para o planejamento fatorial apresentado	400
	na Tabela 5.2	122
Tabela 5.4 -	Matriz experimental para o planejamento Box-Bennken	12/
Tabela 5.5 -	Kesultados da ANOVA para o planejamento Box-Belliken	120
	Valores criticos oblidos na otimização Box-Berniken	128
Tabela 5.7 -	matriz experimental do planejamento fatorial para avallação da	120
Tabala E 9	ANOVA do planoiamento fatorial para avaliação da robustoz	120
Tabela 5.0 -	Efeite des espécies concemitantes na determinação de antimônio	120
Tabela 5.9 -	Características apolíticas do procedimentos para a determinação	122
Tabela 5.10 -	do antimônio ovolorando EDN	125
Tabola E 11	Valores módios o incortozas para a determinação de antimônio em	122
1 97619 2.11 -	valores medios e incercezas para a decerminação de antimorilo em	126
Tabola E 12	Valores módios o incortozas para a determinação do antimônio em	120
1 avela 3.12 -	valores medios e incercezas para a decerminação de antimorilo em	126
	amushas ue aguas hatulais	T20

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Amostra
AA: Ácido ascórbico
APHA: Associação de Saúde Pública Americana (do inglês American Public Health Association)
ANOVA: Análise de Variância
B _i : Reatores helicoidais
BQA: Sal dissódico do ácido 2-2'-biquinolino-4,4'-dicarboxílico
Bqb: Bis(2-quino-linocarboxamido)-1,2-benzeno
Br-PADAP: 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol
C: Transportador
C ₁₈ : Sílica funcionalizada C ₁₈
CCD: Dispositivos de carga acoplada (do inglês Charge-Coupled Devices)
CDA: Cianeto Dissociável em Ácidos
CENA: Centro de Energia Nuclear na Agricultura
CMC: Concentração Micelar Crítica
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
CV: Coeficiente de variação
D: Recipiente de descarte
DET: Cela de fluxo acoplada ao detector espectrofotométrico
DLLME: Micro-extração líquido-líquido dispersiva
EC: Eficiência de concentração
EF: Fator de enriquecimento
EFS: Extração em fase sólida
ELC: Espectrometria com longo caminho óptico
ELL: Extração líquido-líquido
EPN: Extração em ponto nuvem
EPS: Espectrofotometria em fase sólida
ETAAS: Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica

ETV-ICP OES: Espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma acoplado indutivamente e vaporização eletrotérmica

ETV-ICP-MS: Espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente e vaporização eletrotérmica

- F: Fonte de radiação
- FA: Frequência de amostragem
- FAAS: Espectrometria de absorção atômica com chama

FI-ETV-ICPOES: Sistema de análises em fluxo com espectrometria de emissão óptica com atomização eletrotérmica e fonte de plasma acoplado indutivamente

- FC: Fator de concentração
- FE: Fator de enriquecimento
- FA: Análises em fluxo
- FIA: Análises por injeção em fluxo
- FRS: Fase Rica em Surfactante
- GF AAS: Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
- gl: Graus de liberdade
- HG-AAS: Absorção atômica com geração de hidretos
- HPA: Hidrocarboneto policíclico aromático
- HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês High Performance Liquid Cromatography)
- IC: Índice de consumo
- ICP OES: Espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente
- K_f: Constante de formação de complexo
- LCW: Celas com guias de onda (do inglês liquid -core waveguide)
- LD: Limite de detecção
- LED: Diodo emissor de luz (do inglês Light Emitting Diode)
- M: Membrana polimérica
- MCFA: Sistemas de análises em fluxo com multicomutação
- MPFS: Sistema de análises em fluxo com multi-impulsão
- MQ: Média quadrática
- MSFIA: Sistemas de análise em fluxo com multi-seringa
- MWCNT: Nanotubos revestidos de carbono

OMS: Organização Mundial da Saúde

p = Nível de probabilidade

PEEK: Poliéter-éter-cetona

PEG: Polietilenoglicol

P_i: Microbombas solenoide

PTFE: Politetrafluoretileno

PUF: Espuma de poliuretano

Q: Termo quadrático

R_{EX}: Média das respostas obtidas a partir dos experimentos

Ri: Soluções dos reagentes

R_{PC}: Média das respostas obtidas para o ponto central

S: Bomba tipo seringa

SDS: dodecil sulfato de sódio (do inglês sodium dodecyl sulfate)

SL: Solução de limpeza

SFA: Sistemas de análises em fluxo segmentado

SIA: Sistemas de análises por injeção sequencial

SQ: Soma quadrática

TAN: 1-(2-tiazolilazo)-2-naftol

Triton X-100: Polioxietileno (9-10) t-octil fenol

Triton X-114: Polioxietileno (7-8) t-octil fenol

UDG: Unidade de difusão gasosa

USEPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês United States Environmental Protection Agency)

V: Válvula solenoide

Va: Volume de amostra

VS: Válvula seletora de 8 vias

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO
1.1.	Análises por injeção em fluxo
1.1.1.	Sistemas de análises em fluxo com multicomutação
1.1.2.	Sistemas de análises em fluxo com multi-impulsão
1.1.3	Sistemas lab-in-syringe
1.2.	Técnicas de separação
1.2.1.	Extração líquido-líquido
1.2.2.	Extração em ponto nuvem
1.2.3.	Extração em fase sólida
1.2.4.	Separação gás-líquido
1.3.	Espectrofotometria com longo caminho óptico
2.	OBJETIVOS
3.	SISTEMA DE ANÁLISES EM FLUXO COM MULTI-IMPULSÃO E ESPECTROFOTOMETRIA COM LONGO CAMINHO ÓPTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE CIANETO DISSOCIÁVEL EM ÁCIDOS EM ÁGUAS NATURAIS
3.1.	Introdução
3.2.	Experimental
3.2.1.	Equipamentos e acessórios
3.2.2.	Reagentes e soluções
3.2.3.	Procedimento
3.2.4.	Procedimento de referência
3.3.	Resultados e discussão
3.3.1.	Aspectos gerais
3.3.2.	Otimização
3.4.	Características analíticas e aplicação
3.5.	Conclusões
4.	NOVA ABORDAGEM PARA A EXTRAÇÃO EM PONTO NUVEM EM SISTEMAS EM FLUXO
4.1.	Introdução
4.2.	Experimental
4.2.1.	Equipamentos e acessórios
4.2.2.	Reagentes e soluções
4.2.3.	Procedimento
4.2.4.	Procedimento de referência
4.3.	Resultados e discussão
4.3.1.	Aspectos gerais
4.3.2.	Otimização do procedimento
4.4.	Características analíticas e aplicações
4.4.1.	Efeito de espécies concomitantes
4.4.2.	Análises de amostras de águas naturais e materiais de referência
45	Conclusões
4.3.	Conclusions.

5.	EXTRAÇÃO EM PONTO NUVEM EM LINHA EMPREGANDO SISTEMA <i>LAB-</i> IN-SYRINGE PARA A DETERMINAÇÃO DE ANTIMÔNIO	109
5.1.	Introdução	109
5.2.	Materiais e métodos	111
5.2.1.	Equipamentos e acessórios	111
5.2.2.	Reagentes e soluções	112
5.2.3.	Procedimento de referência	113
5.2.4.	Sistema lab-in-syringe	113
5.3.	Resultados e discussão	115
5.3.1.	Aspectos gerais	115
5.3.2.	Otimização multivariada	120
5.4.	Características analíticas e aplicações do procedimento	131
5.5.	Conclusões	137
6.	CONCLUSÕES FINAIS	138
	REFERÊNCIAS	140

1. INTRODUÇÃO

1.1. Análises por injeção em fluxo

A análise por injeção em fluxo, como proposta em 1975, era baseada na inserção da amostra, com uma seringa hipodérmica, em fluxo contínuo em linha única. A amostra passava por transformações químicas e/ou físicas durante o transporte até o sistema de detecção [1]. A primeira modificação deste sistema foi a adaptação de confluências que permitiram inserir diferentes reagentes na zona de amostra, sem que a mistura fosse dependente da dispersão. Posteriormente, injetores proporcionais e válvulas rotatórias foram empregados em substituição às seringas, melhorando a reprodutibilidade na inserção da amostra e tornando este processo independente da habilidade do operador.

De forma geral, os sistemas de análises em fluxo utilizam um propulsor para as soluções (reagentes e amostra), tubulações para condução dos fluidos, mistura e reação e um sistema de detecção. O espaço que a amostra irá percorrer dentro da tubulação é denominado percurso analítico [2]. Para a propulsão das soluções, podem ser empregadas bombas peristálticas, microbombas solenoide e módulos de seringas, sendo que a bomba peristáltica é a mais usual em virtude da robustez. Para o bom desempenho dos sistemas, a bomba necessita de torque suficiente para garantir vazão constante. Outra possibilidade é explorar a ação da gravidade, contudo o comprimento do percurso analítico, o diâmetro da tubulação e a viscosidade das soluções podem afetar a vazão dos fluidos e, consequentemente, diminuir a versatilidade dos sistemas [2].

O procedimento analítico em um sistema em fluxo pode envolver diversos passos desde a injeção da amostra no fluxo transportador até a obtenção do sinal analítico, por exemplo, pré-tratamento da amostra, misturas de reagentes, derivação química e separação de fases. A região em que se encontra a fração da amostra e que passa pelas diferentes etapas do processo analítico é denominada zona de amostra [3].

A alíquota injetada no fluxo transportador pode ser definida em função do volume da amostra ou do tempo de amostragem [4], sem segmentação para a separação das zonas de amostra entre cada injeção. Quando a amostra é selecionada em função do volume, usualmente são utilizadas válvulas rotatórias de 6 vias [5] ou injetores proporcionais [2]. Para a inserção da amostra em função do tempo, válvulas solenoide (ou válvulas rotatórias de 8 vias) são normalmente empregadas. Reatores poliméricos são usualmente empregados em configuração helicoidal. O comprimento e o diâmetro da tubulação, juntamente com a vazão, definem o tempo de residência da amostra e afetam a frequência de amostragem, as condições de mistura e a extensão da dispersão [2,5]. O tempo de residência deve ser determinado em função da velocidade das reações e, em casos de reações lentas, a diminuição da vazão ou a parada de fluxo podem ser utilizadas, sendo esta última estratégia usualmente empregada para evitar a dispersão excessiva, e, consequentemente, a redução do sinal analítico e prejuízo à frequência de amostragem. Em caso de dificuldade de mistura, reatores preenchidos com esferas de vidro ou poliméricas também podem ser utilizados. Entre as técnicas de detecção podem ser empregadas a espectrofotometria [6], fluorimetria [7], absorção ou emissão atômica [8], potenciometria [9] entre outras [10-12].

O transporte da amostra em fluxo não segmentado ocasiona dispersão nas interfaces [2]. Por este motivo, a região central da zona de amostra é aquela com maior concentração e as extremidades contém um mínimo de concentração de analito devido às interações com a solução transportadora. O processo é causado por convecção e difusão (radial e axial), sendo dependente do volume de amostra e comprimento do reator e, em menor extensão, da vazão total e o tipo do fluxo (pulsado ou contínuo) [13]. Desta forma, as dimensões da alça de amostragem e do percurso analítico podem ser variadas para a diluição da amostra por dispersão controlada. Entretanto, especialmente o comprimento do percurso analítico pode afetar criticamente a frequência de amostragem.

Além dos sistemas em linha única e em confluência, outras configurações podem ser empregadas, como por exemplo, zonas coalescentes, sistemas com reamostragem ou sistemas em fluxo segmentado. Os sistemas com zonas coalescentes (*merging zones*) são configurados para inserir simultaneamente a amostra e o reagente em um mesmo fluido ou em fluidos transportadores independentes. Quando utilizados transportadores independentes, a interação das duas soluções ocorre da mesma forma que em sistemas em confluência, porém o reagente não é bombeado continuamente, minimizando o consumo [2].

24

Nos sistemas com reamostragem (*zone sampling*), uma fração da zona de amostra dispersa é selecionada e inserida em outro fluxo transportador para uma etapa adicional de dispersão. Esta alternativa é normalmente empregada quando a amostra é muito concentrada [14], permitindo alcançar diluições de até 2000 vezes. Com um injetor temporizado, o controle preciso do tempo permite a seleção de qualquer fração da zona de amostra dispersa.

Os sistemas em fluxo segmentado exploram a inserção de uma fase gasosa nos extremos da zona de amostra. Esta estratégia pode ser explorada como recurso para evitar a dispersão, melhorar a homogeneização entre amostra e reagente devido à convecção e permitir longos tempos de residência com mínimo risco de intercontaminação entre amostras [5]. Uma alíquota de solução de limpeza é periodicamente inserida para a remoção dos resíduos de amostra remanescentes nas paredes da tubulação.

Uma característica importante dos sistemas de análises em fluxo é que tanto a amostra, quanto as soluções de referência são processadas em condições altamente reprodutíveis, incluindo a temporização. Com isto, as medidas podem ser realizadas antes das reações atingirem o equilíbrio químico, sendo possível aumentar a frequência de amostragem e a exploração de aspectos cinéticos. Além disso, os aspectos físicos (tempo de residência e dispersão de amostra), e químicos (pH, temperatura, derivações químicas, cinética de reação etc) também podem ser controlados a fim de atingir melhores respostas analíticas [15].

Uma vantagem dos sistemas de análises em fluxo é a possibilidade de realização de etapas de preparo de amostra em linha (*e.g.* extração líquido-líquido, extração em fase sólida, difusão gasosa e diálise), o que os torna mais atrativos e versáteis [16]. Além disso, o ambiente totalmente fechado evita a contaminação das amostras e do operador, no caso da utilização de reagentes tóxicos [17]. É também interessante a possibilidade de explorar reagentes e produtos instáveis, incluindo suspensões.

De modo geral, a evolução dos sistemas em fluxo é dividida em duas gerações. Na primeira, os sistemas eram basicamente de análises em fluxo segmentado (SFA) e de injeção em fluxo (FIA). Posteriormente, surgiram a análise por injeção sequencial (SIA), análise em fluxo com multicomutação (MCFA) ou análise em fluxo com multi-seringa (MSFIA), controlados por microcomputadores [5]. As modalidades pertinentes a esta Tese serão detalhadas nos itens seguintes.

1.1.1. Sistemas de análises em fluxo com multicomutação

Os sistemas de análises em fluxo com multicomutação empregam diversos dispositivos comutadores, que possibilitam o gerenciamento independente das soluções e alteração da configuração do módulo de análises. As válvulas solenoide de três vias foram os primeiros dispositivos empregados para explorar a multicomutação [18]. Estas válvulas funcionam como um interruptor composto por uma entrada de solução e duas vias de saída (ou duas entradas e uma saída) que permitem direcionar o fluxo [19]. Estes dispositivos são controlados por microcomputador e permitem realizar diferentes etapas do processo analítico. Estes sistemas podem ser incorporados em qualquer das técnicas em fluxo existentes, oferecendo grande versatilidade aos procedimentos desenvolvidos, economia de reagentes por inserir soluções apenas quando requeridas e redução das dimensões dos sistemas [13,18,20].

Em algumas configurações de sistemas com multicomutação, as soluções são aspiradas através de uma única via, mediante uma bomba peristáltica, localizada após a cela de medida. Para a formação do ciclo de amostragem, cada válvula solenoide gerencia uma solução (amostra ou reagentes) e permite a inserção sequencial das alíquotas em um processo denominado amostragem binária. Neste caso, a pressão interna no módulo de análises é sempre menor que a externa, o que pode provocar a formação de bolhas indesejadas [21]. Em outra configuração, as soluções são bombeadas minimizando a geração de bolhas devido à pressão maior que a externa [21]. Neste caso, é necessário um tubo de propulsão para cada solução. O acionamento das válvulas permite a inserção das alíquotas ou a recirculação das soluções. Esta configuração possibilita a injeção das soluções tanto por amostragem binária quanto por zonas coalescentes [16].

O primeiro trabalho que explorou as potencialidades da multicomutação, apresentado em 1994, foi aplicado à determinação de ferro em digeridos de materiais vegetais [18]. Alíquotas de 2 μL de amostra e reagentes foram sequencialmente inseridas no percurso analítico por válvulas solenoide, controladas por um computador. O contato entre as alíquotas favoreceu a mistura de amostra e reagentes, durante a amostragem, devido à dispersão. A aspiração dos fluidos possibilitou o emprego de um único canal de bombeamento, alcançando frequência de amostragem de 220 h⁻¹.

1.1.2. Sistemas de análises em fluxo com multi-impulsão

O emprego de microbombas solenoide consistiu em uma importante inovação em sistemas de análises em fluxo com multicomutação. Estes dispositivos podem ser usados tanto para propulsão de fluidos, quanto para a inserção de amostras e reagentes e facilitam a manipulação discreta de alíquotas de soluções, dispensando com precisão volumes da ordem de microlitros [4]. A maior transferência de massa radial, devido ao fluxo pulsado inerente a estes dispositivos, proporciona melhores condições de mistura e possibilita diminuir as dimensões dos reatores, com consequências sobre a dispersão da amostra e frequência de amostragem. Além disso, observa-se também uma transferência de calor mais eficiente na zona de amostra. Estes fatores favorecem especialmente o desenvolvimento de reações [22]. Assim como nos sistemas com multicomutação um maior número de interfaces amostra/reagente pode ser gerado, incrementando a sensibilidade do procedimento [23].

Uma microbomba solenoide é composta por uma mola, uma haste metálica envolta por um solenoide e um diafragma. Todo o conteúdo da microbomba é envolto em material metálico resistente aos impactos. O funcionamento das microbombas solenoide é baseado na movimentação do diafragma flexível. Para a entrada de solução, uma corrente elétrica atravessa o solenoide, gerando um campo magnético que desloca a haste metálica que comprime a mola posicionada na parte superior, provocando o deslocamento do diafragma e diminuindo a pressão no interior da bomba. Esta diferença de pressão força a entrada de uma alíquota de solução de volume igual àquele da cavidade da microbomba, através da válvula de entrada. Quando cessa a corrente pelo solenoide, a mola empurra a haste metálica para baixo, fazendo o diafragma retornar à posição original. Esta ação dispensa o líquido do interior da microbomba através da válvula de saída, uma vez que a válvula de entrada encontra-se fechada [24]. As válvulas de entrada e saída são unidirecionais e bloqueiam a passagem do líquido em sentido oposto à direção inicial [25]. Desta forma, microvolumes discretos são dispensados, sendo a frequência de pulsação (que deve ser inferior a 5 Hz para garantir a reprodutibilidade) controlada por computador. Esta é uma alternativa interessante para alterar a vazão e implementar parada de fluxo [24].

Uma vantagem das microbombas solenoide em relação às bombas peristálticas é que não é necessária a substituição periódica dos tubos de propulsão [4]. As microbombas solenoide, além de consumirem menos energia, são de baixo custo e possibilitam reduzir as dimensões do módulo de análises, sendo adequadas a análises em campo [26].

Uma comparação entre um sistema FIA com bomba peristáltica e outro com multiimpulsão foi realizada com aplicação à determinação de nitrito em água de mar. As figuras de mérito para o sistema com multi-impulsão (limite de detecção < 0,1 μ mol L⁻¹ NO²⁻, coeficiente de variação < 1% e 60 h⁻¹) foram melhores que com o sistema com bomba peristáltica. Apesar do fluxo pulsado causar distorção no perfil dos sinais, este efeito foi corrigido empregando um reator de maior comprimento (1 m) para melhorar a mistura das soluções [27].

Sistemas de análises em fluxo com multi-impulsão têm sido utilizados especialmente com detecção espectrofotométrica [20,28] e, em menor extensão, fluorimétrica [29]. Medidas turbidimétricas também podem ser realizadas nestes sistemas, com vantagens em relação à propulsão com bombas peristálticas no tocante à deposição de sólidos e efeitos de memória [30]. Esta característica foi explorada para a determinação de sulfato em águas, empregando cela de fluxo de 100 cm para aumento da sensibilidade [30]. A determinação foi baseada na reação de precipitação com íons bário e o fluxo pulsado proporcionado pelas microbombas solenoide foi explorado para melhorar as condições de mistura, minimizar o consumo de reagentes e a de geração de efluentes.

1.1.3. Sistemas lab-in-syringe

Os sistemas de análises em fluxo com multi-seringa (MSFIA) foram propostos por Cerdà *et al.* [31] empregando bombas tipo seringa como propulsores de soluções. Um motor é empregado para movimentar uma barra metálica que, ao deslizar, preenche os êmbolos de até 4 seringas com soluções. Na parte superior de cada seringa está acoplada uma válvula solenoide para desviar o fluxo, sem necessariamente parar a seringa. O fluxo gerado é semelhante ao obtido com as bombas peristálticas, porém caracterizado por menor pulsação e permitindo a seleção de menores volumes com alta precisão. Assim como nos sistemas com multicomutação e multi-impulsão, é possível economizar reagentes uma vez que as soluções são inseridas apenas quando necessárias. Um microcomputador controla todos os dispositivos, especialmente nas etapas de inserção e transporte de soluções [32]. Características importantes dos sistemas de análises em fluxo com multi-seringa são a robustez devida à ausência de tubos de bombeamento, a manipulação segura de solventes agressivos e a possibilidade de realizar operações em confluência ao compreender até 4 canais para inserção de fluidos.

Dispositivos adicionais como válvulas solenoide, de injeção, seletora ou microbombas solenoide podem ser acopladas aos sistemas MSFIA gerando sistemas mais complexos e com melhor desempenho analítico uma vez que permitem operações diversas (*e.g.* pré-concentração, separação do analito e derivação química). Quando se utiliza apenas uma seringa como sistema de impulsão, acoplado a uma válvula seletora, a amostra e os reagentes somente podem ser aspirados sequencialmente (sistemas SIA) [33]. Neste caso, a mistura das soluções e as outras etapas do ciclo de amostragem geralmente ocorrem em reatores helicoidais.

O sistema *lab-in-syringe* foi desenvolvido a partir dos equipamentos utilizados nos sistemas de análises em fluxo com multi-seringa [34]. Assim sendo, o mesmo módulo propulsor é empregado, contudo apenas 1 seringa é requerida. Neste caso, a seringa é usada como recipiente para manipulação das soluções e solventes, para conduzir reações, extrações ou separações líquido-líquido ou gás-líquido. Como estas etapas do processo analítico são realizadas em um sistema fechado, evita-se a contaminação da amostra e minimiza-se os riscos ao analista. As outras seringas do módulo podem ser utilizadas para operações adicionais quando a derivação química é necessária [35]. O módulo de análises é composto por uma seringa, válvulas solenoide, válvula seletora e sistema de detecção, como mostrado na Figura 1.1. A seringa e a cela de fluxo são acopladas à válvula seletora e, para o transporte das soluções, tubos e conectores são empregados. Como alternativa para detecção espectrofotométrica ou fluorimétrica, o sistema de detecção (fonte de radiação e detector) pode ser posicionado diretamente na seringa (Figura 1.1-F e D). Para esta configuração, cabos de fibra óptica podem ser utilizados para o transporte da radiação [35].



Figura 1.1 - Representação esquemática do sistema *lab-in-syringe*. S: bomba tipo seringa; F: fonte de radiação; D: sistema de detecção; V: válvula solenoide; VS: válvula seletora, a qual diferentes soluções e dispositivos (*e.g.* reator e cela de fluxos) podem ser acoplados. Adaptada da Referência 35

Os sistemas *lab-in-syringe* permitem a seleção precisa dos volumes e englobam todas as vantagens dos sistemas de injeção sequencial. Contudo, maiores volumes podem ser empregados devido às melhores condições de mistura tal como nos sistemas em fluxobatelada [36, 37]. A bomba tipo seringa permite que um fluxo bidirecional descontínuo seja obtido, diferente do proporcionado pelas bombas peristálticas.

A primeira aplicação de sistemas *lab-in-syringe* foi para a micro-extração líquidolíquido dispersiva (DLLME) [38], que consiste na rápida injeção de uma mistura de dois solventes (extrator + dispersor) em uma solução aquosa de amostra. A mistura turva que se forma contém gotículas que potencializam a extração, uma vez que o solvente encontra-se totalmente disperso na fase aquosa, ampliando a área superficial para a transferência de fases [39]. Todas as etapas da DLLME podem ser desenvolvidas com os sistemas *lab-in-syringe* [40], evitando os inconvenientes da extração líquido-líquido convencional, que emprega elevadas quantidades de solventes orgânicos, na maioria tóxicos.

Como exemplo da DLLME automatizada nos sistemas lab-in-syringe, pode ser citada a determinação de cobre em águas naturais (mineral, rio, poço e subterrâneas). Nesta proposta, o complexante batocuproína foi adicionado à fase orgânica (menos densa que a água). A dispersão da fase extratora foi realizada por aspiração das fases para o interior da seringa em alta vazão. Após a coalescência das gotículas de solvente na parte superior da seringa, a fase orgânica foi conduzida para uma cela de longo caminho óptico, constituída por um guia de ondas, para detecção espectrofotométrica. A determinação de cobre foi realizada em menos de 4 min, com recuperação quantitativa do analito [40]. Em outra aplicação, a inovação consistiu na agitação mecânica da amostra com o extrator, utilizando uma barra magnética no interior da seringa, para evitar o emprego de um solvente dispersor. A proposta foi aplicada à determinação de surfactantes aniônicos em águas (lagoa, torneira, subterrâneas e residuais) baseada no método do azul de metileno. Neste caso, como o clorofórmio, utilizado como solvente extrator, é mais denso que a água, o mesmo ficou acumulado na parte inferior da seringa. Portanto, a seringa foi usada na posição invertida (*i.e.* com o êmbolo na parte superior) para facilitar a remoção do solvente. Em comparação com o procedimento em batelada, o consumo de clorofórmio foi reduzido em 250 vezes. O tempo requerido para cada determinação foi de *ca*. 6 min [41].

Além das aplicações à DLLME, outra aplicação explorou uma etapa de separação gáslíquido (sem membrana) para a determinação de mercúrio por espectrometria de absorção atômica através da geração de vapor a frio [42]. A seringa foi utilizada como recipiente para manipulação das soluções (amostra e agente redutor SnCl₂) e a zona de amostra foi transferida através da válvula seletora para um separador gás-líquido, posicionado na parte superior do módulo de análises. Os vapores de mercúrio foram então direcionados ao sistema de detecção (AAS) por um gás de arraste (argônio). O sistema completamente fechado foi eficiente para coletar as espécies voláteis formadas na seringa, alcançando limite de detecção de 0,03 μg L⁻¹, faixa de resposta linear entre 0,08 a 10,0 μg L⁻¹ e frequência de amostragem de 27 h⁻¹, consumindo apenas 3 mL de amostra. Os autores também destacaram o potencial para acoplamento a uma unidade de geração de hidretos.

1.2. Técnicas de Separação

Métodos de separação e pré-concentração têm sido frequentemente utilizados em Química Analítica a fim de melhorar a seletividade e a sensibilidade dos procedimentos viabilizando a determinação de espécies em baixas concentrações em matrizes complexas. Alternativas usuais para esta finalidade são co-precipitação [43], deposição eletroquímica [44], troca iônica [45] e extrações líquido-líquido [46] ou sólido-líquido [47]. Em alguns casos, os procedimentos podem ser morosos e tediosos, bem como envolver várias etapas. Perdas das espécies de interesse durante o processo e riscos de contaminações também são usuais [48]. Alternativamente, procedimentos de extração ou de micro-extração automatizados superam essas desvantagens e podem ser consideradas alternativas mais limpas [34, 35, 38, 40, 41]. A seguir, é apresentada uma discussão sobre os principais processos de separação em sistemas de análises em fluxo.

1.2.1. Extração líquido-líquido

Dentre as técnicas de extração/separação, a extração líquido-líquido (ELL) é amplamente difundida em razão da simplicidade de execução e emprego de vidrarias existentes na maioria dos laboratórios químicos. A partição do analito entre as fases orgânica e aquosa é o fundamento desta técnica, sendo possível separar a espécie de interesse de seus interferentes. Adicionalmente, altos fatores de enriquecimento dos analitos podem ser obtidos empregando elevada razão volumétrica entre amostra e o solvente extrator. A ampla aplicabilidade da ELL também se deve à possibilidade de extrair espécies com características distintas pela alteração da polaridade do solvente extrator.

Em geral, as etapas necessárias para a ELL são: (i) adição de solvente à amostra em recipiente apropriado para separação das fases imiscíveis, (ii) agitação (manual ou mecânica) para aumentar o contato entre as fases a fim de aumentar a eficiência de extração, (iii)

período de repouso para promover a separação das fases e (iv) isolamento das fases orgânica e aquosa. Entretanto, as etapas de extração realizadas manualmente são morosas e podem ser prejudiciais ao analista devido à exposição a solventes orgânicos, muitas vezes tóxicos e/ou inflamáveis. Além disso, a fim de aumentar a eficiência de extração, várias repetições são requeridas, tornando o procedimento moroso e gerando um grande volume de efluentes. Apesar da ELL empregar solventes orgânicos em larga escala contrariando os preceitos da Química Limpa [49], encontra-se aplicações recentes, como um procedimento em batelada para a extração de lipídios de amostras de lodo de esgoto [50], visando aproveitamento para a produção de biodiesel. O procedimento para 200 mL de lodo empregou 400 mL de hexano como solvente extrator, com evaporação do solvente em seguida, sendo observados fatores de recuperação superiores aos obtidos pelo método oficial, empregando menos etapas de extração.

A automatização das etapas de extração, utilizando sistemas de análises em fluxo, permite contornar os inconvenientes dos procedimentos em batelada. A redução de erros sistemáticos e do consumo de solventes, a menor exposição do analista a vapores tóxicos, a melhoria de precisão e aumento da frequência de amostragem são aspectos atrativos. Além disso, a extração não necessita ser quantitativa, devido às condições operacionais altamente reprodutíveis [51] e, portanto, somente uma etapa de extração é requerida.

Em geral, na extração (ou microextração) líquido-líquido em fluxo, alíquotas do solvente orgânico e da amostra são inseridas alternadamente e a transferência de massas ocorre nas interfaces entre os segmentos, durante o transporte através do percurso analítico [51]. Previamente à detecção, os segmentos devem ser reagrupados empregando um separador de fases [5]. Esta etapa tem sido o principal entrave da aplicação da ELL nos sistemas em fluxo e muitos esforços têm sido despendidos para contornar este inconveniente, apesar dos diferentes segmentadores e separados desenvolvidos. Outros inconvenientes são a baixa resistência dos tubos aos solventes orgânicos e a baixa eficiência do processo de extração, devido à limitada interface de contato [52].

Recentemente, procedimentos para micro-extração líquido-líquido em fluxo, sem a separação de fases, foram propostos para a determinação do anti-hipertensivo diltiazem [51], de surfactantes aniônicos [53] em águas e de índice de iodo em biodiesel [54]. Nestes

trabalhos, a multicomutação empregando válvulas solenoide foi explorada para o processo de extração do analito. A zona de amostra foi conduzida por um tubo de vidro que consistia na cela de detecção. Dessa forma, o sinal analítico foi registrado sem necessitar de separação das fases (orgânica e aquosa). Outra forma de automatizar a extração líquidolíquido sem utilizar a separação de fases é com os sistemas *lab-in-syringe*. Como mencionado anteriormente, estes sistemas permitem realizar todos os processos de extração dentro da seringa, além de procedimentos adicionais como alteração de pH e adições de padrão. Nestes casos, depois da coalescência da fase orgânica, todo o volume de amostra é conduzido ao sistema de detecção, sem separação das fases, para obtenção do sinal analítico. Como exemplo, estes sistemas foram aplicados para a extração de cobre [40], surfactantes [41], alumínio [55] e cromo [56] em águas.

1.2.2. Extração em ponto nuvem

A extração em ponto nuvem (EPN) é uma alternativa atraente à ELL convencional por substituir os solventes orgânicos por surfactantes no processo de extração. A EPN foi empregada pela primeira vez em 1978 para a pré-concentração de Zn(II), após a formação de complexo com 1-(2-piridilazo)-2-naftol [57].

Os surfactantes (termo originado da expressão em inglês *surface-active agent*) são moléculas orgânicas que apresentam a propriedade de diminuir a tensão superficial do meio em que estão dissolvidos [58]. Por esta razão, são também denominados tensoativos. As moléculas apresentam característica anfifílica (*i.e.* contém regiões hidrofílica e hidrofóbica) e estrutura do tipo R-X, em que R refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto (linear, ramificada ou contendo anéis aromáticos) e X representa um grupo polar ou iônico [59]. Abaixo da concentração micelar crítica (CMC), em soluções aquosas, os surfactantes encontram-se predominantemente na forma de monômeros não associados. Quando em concentração acima da CMC ocorre um agrupamento espontâneo formando os agregados de surfactantes ou agregados micelares. Estes sistemas se encontram em equilíbrio dinâmico com os monômeros em solução, reversíveis por diluição [60]. Na Tabela 1.1 são apresentados os surfactantes mais comumente usados em aplicações analíticas.
Тіро	Agente tensoativo		
	Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB)		
Catiônicos	Brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB)		
	Cloreto de cetilpiridínio (CPC)		
	Dodecil sulfato de sódio (SDS)		
Aniônicos	Bis(2-etilhexil) sulfossuccinato de sódio (Aerossol OT)		
	Dihexadecil fosfato (DHF)		
	Polioxietileno (9-10) t-octil fenol (Triton X-100)		
Não iônicos	Polioxietileno (7-8) t-octil fenol (Triton X-114)		
	Polioxietileno (23) dodecanol (brij)		
Anfóteros	3-(dodecildimetil amônio) propano 1-sulfato (SB-12)		
	4-(dodecildimetil amônio) butirato (DAB)		

Tabela 1.1. Surfactantes mais empregados em Química Analítica. Adaptado da referência 59

Na extração em ponto nuvem ocorre a separação de espécies hidrofóbicas, que ficaram envolvidas no interior das micelas de surfactantes não iônicos [61]. A separação de fases ocorre por aquecimento ou adição de sais e formam-se duas fases, uma de maior volume, contendo concentração de surfactante próxima à CMC e uma fase rica em surfactante, contendo as espécies extraídas. Nos procedimentos em batelada, usualmente, uma etapa de centrifugação é empregada para acelerar a separação das fases [58]. Para a extração de metais, geralmente é necessária a formação prévia de um complexo hidrofóbico. Desta forma, fatores como constante de formação do complexo e velocidade da reação também devem ser considerados [58,61].

As etapas envolvidas na extração em ponto nuvem em batelada incluem: (i) adição de surfactante à solução aquosa em concentração acima da CMC; (ii) separação de fases devido ao aquecimento em temperatura acima da necessária para a formação do ponto nuvem (ou indução do ponto nuvem pela adição de sais); (iii) centrifugação para acelerar a

separação das fases e (iv) isolamento da fase rica em surfactante (FRS), usualmente com diluição para a redução de viscosidade antes da medida.

Para o emprego da EPN deve-se levar em consideração (i) as propriedades físicoquímicas da amostra, (ii) a hidrofobicidade do produto formado com a espécie de interesse (*e.g.* extração de metais [62- 64] ou espécies orgânicas [58,62,65]) e (iii) o tipo de surfactante (*e.g.* ponto nuvem em temperatura que não afete a estabilidade da espécie de interesse [58,62,66 - 68]). Outros parâmetros como pH, concentração de surfactante, força iônica e tempos de incubação, aquecimento e centrifugação também podem afetar a eficiência da extração [69].

Alguns parâmetros permitem a avaliação da eficiência da extração e a comparação entre procedimentos [70]. O fator de concentração (FC) é definido como a razão entre os volumes das fases rica e aquosa, assumindo que houve transferência quantitativa do analito para a fase micelar [61]. Este parâmetro difere do fator de enriquecimento (FE) que é definido pela razão dos coeficientes angulares das curvas de calibração obtidas na presença e na ausência de surfactante, obtidas nas mesmas condições [70]. O FE leva em consideração outros fatores que causam aumento de sinal analítico, além do efeito da pré-concentração como, por exemplo, o aumento do sinal analítico em espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) pela presença de solvente na nebulização [70]. Este parâmetro tem sido utilizado com frequência em sistemas de análises em fluxo e, em alguns trabalhos, tem sido denominado Fator de Concentração Aparente [71].

As vantagens da EPN incluem elevada eficiência de extração [72], sendo pequenas quantidades de surfactante requeridas para extração com elevados volumes de amostra e baixa toxicidade e inflamabilidade do surfactante, sendo aplicáveis a várias técnicas de detecção (*e.g.* espectrofotometria UV-vis [73], fluorimetria [74], FAAS [75-76], GFAAS [77] e cromatografia [78]). Entretanto, apresenta uso limitado para a extração de substâncias polares, o que é frequentemente superado utilizando derivação química [58]. Conforme mencionado anteriormente, outro inconveniente é a necessidade de reduzir a viscosidade da fase rica através da diluição da FRS previamente à detecção, reduzindo o ganho de sensibilidade obtido com a etapa de pré-concentração.

Cada surfactante apresenta uma temperatura mínima para atingir o ponto nuvem e causar a separação das fases. O ponto nuvem pode ser alterado pela adição de sais, álcoois, compostos orgânicos ou uso de misturas de surfactantes [58], sendo possível ajustá-lo para a aplicação analítica de interesse. Triton X-114 é o surfactante mais comumente empregado em procedimentos analíticos explorando EPN, uma vez que atinge o ponto nuvem em temperatura próxima à ambiente (22 a 25 °C) [58].

O fenômeno denominado efeito *salting out* é frequentemente explorado para reduzir o ponto nuvem quando a temperatura afeta diretamente a estabilidade das espécies de interesse (*e.g.* proteínas se desnaturam em temperaturas maiores que 40 °C) ou quando se espera evitar um dispositivo de aquecimento para indução do ponto nuvem. Como exemplo, pode-se citar a avaliação do efeito da adição de eletrólitos numa mistura de surfactantes (*e.g.* Triton X-114, SDS e CTAB) [79]. Foi observado que o ponto nuvem decresceu drasticamente em virtude das repulsões eletrostáticas entre as micelas, devido à alteração na força iônica da solução. De forma geral, uma mistura de surfactantes apresenta a média das temperaturas individuais como temperatura final de ponto nuvem [58,61].

1.2.3. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (EFS), ou extração sólido-líquido, é uma das técnicas de extração mais empregadas em virtude da facilidade de utilização e possibilidade de alcançar fatores de enriquecimento elevados. Em geral, a amostra é colocada em contato com a fase sólida para passagem por um cartucho contendo material adsorvente. Neste processo, os analitos são retidos na fase sólida e podem ser eluídos com um solvente apropriado e determinados no eluato ou medidos diretamente no suporte sólido [5,80]. A pré-concentração ocorre uma vez que o volume de amostra pode ser significativamente maior que o volume de eluente. O processo também pode ser explorado para a separação de potenciais interferentes pela retenção destas espécies em uma fase sólida que não apresenta afinidade pelos analitos.

A fase sólida deve ter uma grande área superficial para favorecer sua interação com as espécies de interesse na amostra. No processo de adsorção, o analito interage (reações químicas, troca-iônica ou adsorção física) com os grupos funcionais disponíveis na superfície do sólido [81]. Diferentes materiais podem ser diretamente utilizados como fase sólida (*e.g.* resinas de troca iônica, celulose, polímeros). Outros suportes (sílica gel, alumina ou zircônia) podem ser modificados (*e.g.* reações químicas, imobilização de compostos orgânicos, processos físicos) para formar diferentes grupos funcionais na superfície, incrementando as aplicações analíticas e, especialmente, melhorando a seletividade. Dentre estes, a sílica gel é um dos materiais mais aplicados devido à estabilidade térmica, química e mecânica [47]. O analito deve ter grande afinidade com os grupos funcionais para garantir a extração. Esta afinidade deve ser reversível para permitir a eluição do analito quando as características do solvente forem alteradas, evitando efeito de memória.

A extração em fase sólida realizada manualmente é lenta, sujeita a erros e perdas da espécie de interesse. A eluição, geralmente com um solvente orgânico, pode gerar efluentes tóxicos em volumes elevados [80]. Visando superar as dificuldades observadas em procedimentos em batelada, o primeiro trabalho explorando a EFS em sistemas de análises em fluxo objetivou a determinação de amônio em águas [82]. Uma coluna de troca iônica (Amberlite IRA-120) foi diretamente adaptada em um injetor proporcional, em substituição à alça de amostragem, com a aspiração da amostra diretamente através da coluna. Desta forma, foi possível concentrar o analito melhorando significativamente o limite de detecção (200 μg L⁻¹). Este método também reduziu o volume de reagente (Nessler) sendo utilizado apenas 40 μL por amostra.

As vantagens do emprego da EFS em sistemas de análises em fluxo são a melhora de precisão e da frequência de amostragem, facilidade de automação e minimização do consumo de amostras e reagentes. Entretanto, requisitos importantes devem ser levados em consideração, como a reversibilidade da retenção do analito, estabilidade do suporte nas condições de trabalho (retenção do analito e eluição), cinética de retenção do analito na fase sólida e possibilidade de aumento de contra-pressão, que pode ser contornada com o uso de colunas e partículas sólidas com dimensões adequadas. Nas aplicações em que o reagente é imobilizado no suporte sólido, as condições operacionais devem ser definidas de forma a minimizar a lixiviação [83]. Espectrofotometria em fase sólida, um caso particular de EFS, tem sido implementada utilizando celas comerciais ou configuradas para superar dificuldades como o aumento da contra-pressão e atenuação excessiva do feixe de radiação

por absorção ou espalhamento de radiação [83]. Neste caso, as medidas de absorção da radiação são realizadas diretamente no suporte sólido em que foi retido o analito ou o produto de uma reação com o analito [66,84].

1.2.4. Separação gás-líquido

Espécies gasosas ou que podem ser convertidas ao estado gasoso podem ser eficientemente separadas dos potenciais interferentes em solução [85]. Esta estratégia tem sido indicada inclusive em procedimentos oficiais (*e.g.* Standard Methods [86]). Entretanto, a reprodutibilidade é geralmente prejudicada quando o processo é realizado em batelada (*e.g.* destilação), uma vez que as condições operacionais são difíceis de serem mantidas.

A mecanização da separação gás-líquido empregando sistemas de análises em fluxo é usualmente realizada pelo acoplamento de uma câmara de difusão gasosa. O ambiente fechado assegura a integridade do analista (*e.g.* difusão de espécies tóxicas), evita perdas de analito e contaminação do ambiente (ou vice-versa). Destaca-se também a melhoria de precisão devido às condições operacionais altamente reprodutíveis. Análise por injeção em fluxo, análise por injeção sequencial, sistemas com multi-seringa ou com multi-impulsão foram satisfatoriamente utilizados para separações gás-líquido [3,87]. Neste processo, o analito é convertido a uma espécie volátil por uma reação ácido-base antes da separação (*e.g.* carbonato, cianeto, sulfeto e amônio), ou o analito é volátil o suficiente para promover a separação do líquido (*e.g.* etanol e ozônio) [70].

Como regra, dois fluxos distintos são empregados, sendo separados por uma membrana hidrofóbica permeável a gases (geralmente de PTFE). O fluxo doador, no qual ocorrem as reações para a formação das espécies gasosas, geralmente percorre a parte inferior da câmara. No outro lado da membrana flui a solução aceptora, que tem a função de reter a espécie gasosa que difundiu no processo, normalmente através de uma reação química. As vazões dos fluidos doador e aceptor, o sentido e o tipo dos fluxos (constante ou pulsado), a geometria da câmara (e consequentemente a área de contato) e o tempo de residência da zona de amostra em contato com a membrana são fatores importantes para a otimização da difusão gasosa em sistemas de análises em fluxo. Estes fatores afetam

diretamente as etapas que ocorrem desde a liberação do analito no doador até sua retenção no aceptor (*e.g.* formação da espécie volátil, partição entre o doador e a membrana, transporte através dos poros, partição entre a membrana e o aceptor e gradientes de concentração de ambos os lados da membrana) que determinarão a transferência de massas da espécie gasosa, podendo afetar a eficiência de separação e, portanto, a sensibilidade.

A Figura 1.2 apresenta a ilustração de uma câmara de difusão empregada em análises em fluxo, geralmente construída no próprio laboratório de pesquisa, com materiais de baixo custo. A maior vantagem da difusão gasosa é a possibilidade de melhorar a seletividade do procedimento, visto que o analito é separado das espécies interferentes presentes na matriz. Após a difusão gasosa, derivações químicas podem ser realizadas previamente à detecção visando obter maiores respostas analíticas [70].



Figura 1.2 - Esquema de uma câmara de difusão gasosa modelo sanduíche. (a) vista lateral e (b) vista superior da câmara - 1a: entrada do fluxo aceptor; 1b: saída do fluxo aceptor; 2a: entrada do fluxo doador; 2b: saída do fluxo doador; 3: membrana permeável; 4: peças de material polimétrico; 5: parafusos para fixação das peças. Adaptado da Referência 70

Geralmente, apenas de 5 a 20 % das espécies gasosas contidas no fluxo doador difundem pela membrana. Visando compensar esta baixa eficiência, fatores como diferença de pressão entre os canais, diferentes vazões dos fluidos (ou mesmo a parada do fluxo aceptor), configuração da câmara de difusão (em espiral ou em serpentina) e aumento da área de contato podem ser explorados [70]. Outra alternativa é o acoplamento com técnicas de detecção de alta sensibilidade. Por outro lado, uma vez que o processo geralmente ocorre sem atingir o equilíbrio, esta condição pode ser favoravelmente explorada a fim de aumentar a seletividade através da discriminação cinética [70].

A primeira separação gasosa em sistemas de análises por injeção em fluxo foi desenvolvida por pesquisadores do CENA [88]. A remoção de interferentes da matriz foi realizada com uma câmara denominada unidade de destilação isotérmica (sem membrana). O aparato foi construído com duas tiras de borracha de silicone presas por duas placas de acrílico. Nitrogênio total foi determinado em digeridos de materiais vegetais após a alcalinização da amostra para formação de amônia em linha e reação com o reagente de Nessler após a difusão. Ótimas figuras de mérito como baixo consumo de reagente (100 µL), elevada frequência de amostragem (100 h⁻¹) e coeficiente de variação de 3% foram encontradas.

Outra geometria de câmara bastante utilizada consiste no emprego de tubos concêntricos [70]. Neste caso, a membrana é confeccionada em forma tubular e no seu interior percorre um dos fluxos (geralmente o doador). A difusão das espécies voláteis ocorre pelos poros da membrana para serem recolhidas no aceptor, que flui através do tubo externo. Este tipo de câmara usualmente aumenta a eficiência de difusão uma vez que o formato cilíndrico aumenta a área de contato.

A versatilidade dos sistemas de análises em fluxo possibilitou acoplar até duas câmaras de difusão, visando à determinação simultânea de CO_2 e SO_2 em vinhos [89]. As duas câmaras foram colocadas em sequência, no fluxo doador. Na primeira, a amostra se mistura com ácido para liberação de CO_2 e SO_2 . No entanto, o aceptor verde de malaquita reage seletivamente com SO_2 difundido. O fluxo doador remanescente foi conduzido até a segunda câmara, previamente misturado com H_2O_2 para oxidação de SO_2 que não difundiu. Desta forma, CO_2 foi determinado utilizando um indicador ácido-base azul de bromotimol como aceptor. Este método permitiu a determinação simultânea de dois analitos muito importantes em amostras de vinhos, sem requerer um tratamento prévio e com alta frequência de amostragem (40 h⁻¹).

A pervaporação é outra estratégia para a separação de espécies gasosas, com base na evaporação das espécies voláteis devido ao aquecimento da solução da amostra e condensação em uma membrana [90]. Basicamente, o módulo de pervaporação consiste em um recipiente (na parte inferior) onde a amostra é inserida para favorecer a evaporação. Na parte superior, uma membrana permite a condensação das espécies gasosas e a difusão, para serem coletadas num fluxo aceptor. O processo ocorre sem que a amostra entre em contato com a membrana, sendo possível associar tanto as vantagens da evaporação quanto da difusão gasosa. O aparato deve ser inserido em um banho com temperatura controlada para favorecer a evaporação dos analitos e assegurar a repetibilidade do processo. Microondas também podem ser utilizadas para o aquecimento [91]. A transferência de massa das espécies gasosas é usualmente maior que a obtida com a difusão gasosa convencional.

1.3. Espectrofotometria com longo caminho óptico

A espectrofotometria de absorção molecular baseia-se na medida da absorção de radiação nas regiões ultravioleta e visível por moléculas ou íons em solução. As medidas espectrofotométricas são fundamentadas na lei de Lambert-Beer, em que a absorbância é diretamente proporcional à quantidade de espécies absorventes que interagem com o feixe de radiação que, por sua vez, depende da concentração e do caminho óptico da cela de medida.

Uma medida espectrofotométrica convencional envolve o uso de uma fonte de radiação, lentes para direcionar e focar o feixe, recipiente para a amostra, monocromador (ou filtros espectrais em equipamentos mais simples) e um foto-detector [92]. As celas espectrofotométricas convencionais são construídas com um material transparente à radiação, sendo as medidas baseadas em transmissão. São comumente empregadas celas de 1 cm de caminho óptico, podendo chegar até 10 cm, porém a atenuação excessiva do feixe de radiação e aumento do volume interno podem se tornar críticos [93,94]. A absorção, reflexão e espalhamento de radiação também contribuem para a atenuação da radiação, podendo aumentar o ruído e deteriorar o limite de detecção [95].

Visando o aumento de sensibilidade e contornar os inconvenientes anteriormente mencionados, celas construídas com guias de onda (e.g. LCW) têm sido empregadas [93,94]. Nesta estratégia, a cela de medida comporta-se como uma fibra óptica e a radiação pode ser conduzida por longos caminhos, com perdas mínimas, devido ao fenômeno da reflexão total interna [96]. Nos primeiros trabalhos empregando guias de onda [93], celas de vidro eram recobertas com materiais refletores (e.g. alumínio ou prata) e lasers ou lâmpadas de xenônio ou tungstênio eram utilizados como fontes de radiação. No estudo realizado por Lei et al. [93], observou-se aumento de 300 vezes da absorbância, na determinação de fósforo em águas naturais, com a cela de 1 m em relação à cela de 1 cm, sendo este incremento maior que o previsto pela Lei de Beer. Um inconveniente é que as celas deveriam ser dispostas linearmente. Isto foi superado utilizando celas de vidro preenchidas com solventes orgânicos com índice de refração maior que o do vidro (n = 1,474) [96]. Com esta estratégia, as celas puderam ser enroladas sem afetar a transmissão do feixe de radiação, devido ao processo de reflexão total interna, com aumento da sensibilidade em até 3000 vezes [97]. Entretanto, solventes orgânicos que atendem ao requisito acima mencionado são tóxicos (e.g. CS₂, n = 1,62).

Atualmente os guias de ondas podem ser construídos com materiais poliméricos da família Teflon AF[®], que apresentam índice de refração (1,29 e 1,31) inferior ao das soluções aquosas diluídas (1,33) no qual será feita a medida de absorbância [96]. Estas celas são designadas pela sigla LCW, do inglês *liquid-core waveguide*. Usualmente são empregadas celas de 100 cm (volume interno de 250 μ L), sendo encontradas comercialmente celas com até 500 cm, que aumentam a sensibilidade em até duas ordens de grandeza.

O fenômeno da reflexão total interna ocorre quando o feixe de radiação atravessa uma interface com índice de refração maior (*e.g.* água) para uma região com índice de refração menor (*e.g.* Teflon AF[®]) com um ângulo de incidência de acordo com o cone de aceitação (Figura 1.3). No caso do Teflon AF 2400[®], o ângulo de incidência (θ) deve ser menor que 14,1° [95]. Dessa forma, a radiação incidente será refletida em virtude do material com que a cela é construída ou recoberta, de acordo com a lei de Snell [95,98]. A Figura 1.3 ilustra o fenômeno da transmissão da luz no guia de ondas.



Figura 1.3 - Esquema da transmissão da luz em um guia de ondas: (θ) ângulo de incidência; (n_1) índice de refração no recobrimento da cela; (n_2) índice de refração da solução aquosa. Condição: $n_1 < n_2$. Adaptado da referência 92

Para o emprego das celas capilares com guias de onda, alguns aspectos devem ser levados em consideração. O aumento do sinal do branco quando espécies absorventes estão presentes nesta solução, as perturbações causadas por alterações no índice de refração na zona de amostra (Efeito Schlieren), bolhas de ar e sólidos em suspensão, podem causar alterações na propagação da radiação no interior do guia de ondas e afetar as respostas, deteriorando a precisão [95]. Estes aspectos podem ser mais críticos que utilizando celas de 1 cm de caminho óptico, devido ao maior comprimento e menor diâmetro das celas LCW.

O acoplamento das celas de longo caminho óptico aos sistemas de análises em fluxo normalmente não requer alterações físicas nos módulos de análises. Entre as técnicas de detecção que podem ser empregadas, encontram-se espectrofotometria [96,99], a turbidimetria [30], a quimiluminescência [98], a fluorescência [100] e a espectroscopia Raman [98,101].

No caso de medidas turbidimétricas, cuidados especiais devem ser tomados para evitar o acúmulo de sólidos no interior da cela [98]. Um exemplo é o emprego de cela LCW para a determinação turbidimétrica de sulfato em águas naturais [30]. Neste trabalho, microbombas solenoide foram exploradas para melhorar as condições de mistura amostra/reagentes e evitar desvios na linha de base devidos ao acúmulo de sólidos. Também com este objetivo, uma etapa de lavagem com EDTA foi utilizada para a dissolução do BaSO₄. Outra interessante aplicação das celas de longo caminho óptico foi o desenvolvimento de um equipamento portátil para análises multiparamétricas em fluxo. Uma cela com guia de ondas (Teflon AF[®] com 50 cm) e um espectrofotômetro com arranjo de detectores foram utilizados para a determinação de cromo e alumínio em águas [102]. O equipamento também apresenta potencial para a determinação de outros analitos e a sensibilidade obtida foi 50 vezes maior que com a cela de 1 cm. O equipamento pode ser empregado em medidas espectrofotométricas e fluorimétricas em campo.

2. Objetivos

O objetivo geral desta Tese foi desenvolver procedimentos analíticos em sistemas em fluxo com multi-impulsão ou baseados no conceito *lab-in-syringe* empregando separação e concentração em linha por extração em ponto nuvem ou difusão gasosa. Como objetivos específicos, foram desenvolvidos procedimentos para a determinação de cianeto dissociável em ácidos em águas, de ferro em águas e alimentos e de antimônio em águas e medicamentos para leishmaniose. Buscou-se o desenvolvimento de procedimentos mais limpos, rápidos, sensíveis, ambientalmente mais amigáveis e adequados aos limites de concentração estabelecidos pelas normas vigentes.

3. SISTEMA DE ANÁLISES EM FLUXO COM MULTI-IMPULSÃO E ESPECTROFOTOMETRIA COM LONGO CAMINHO ÓPTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE CIANETO DISSOCIÁVEL EM ÁCIDOS EM ÁGUAS NATURAIS

3.1. Introdução

Cianeto é um poluente altamente tóxico que pode ser encontrado tanto em águas superficiais e subterrâneas quanto em materiais biológicos. Como exemplo, mais de 2000 espécies de plantas contêm glicosídeos que liberam cianeto por hidrólise ácida, sendo fontes naturais de contaminação de águas e solos [103]. Acredita-se que a produção de cianeto por estas plantas é uma espécie de defesa natural contra pragas [104]. Cianeto é também produzido em larga escala para o emprego em galvanoplastia, metalurgia e mineração (*e.g.* extração de ouro e prata) [105,106], o que produz um grande volume de efluentes, com prejuízo ao meio ambiente.

A toxicidade aguda de cianeto ocorre mesmo em baixas concentrações, devido à ação inibitória na transferência de oxigênio pelas células, causando sérios danos a órgãos importantes, como cérebro, coração e pulmões, que requerem elevadas quantidades de oxigênio em seus tecidos [105]. Estima-se que a concentração fatal em seres humanos é de 546 µg L⁻¹ de HCN após 10 min de exposição [107], mas há relatos de mortes com concentrações menores. A exposição crônica em concentrações mais baixas provoca alterações neurológicas e disfunção dos hormônios da tireoide. Nos mamíferos, a toxicidade desta espécie ocorre por todas as vias de administração [104].

Uma interessante aplicação no tratamento de efluentes contendo cianeto proveniente de atividades industriais é o emprego de bactérias (*e.g. Pseudomonas Thiobacillus* e *Arthrobacter*) que utilizam CN⁻ como fonte de energia. Este tratamento alternativo previamente ao descarte pode contribuir para a redução do impacto ambiental [108].

A Resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente [109], que classifica os corpos aquáticos e estabelece as condições de lançamento de efluentes, determina o limite máximo permitido de cianeto livre em águas doces de classe I em 5 μg L⁻¹. Esta classificação refere-se às águas destinadas ao abastecimento, à proteção das comunidades aquáticas, à recreação de contato primário, à irrigação de hortaliças e à proteção das comunidades aquáticas em terras indígenas [109]. O mesmo limite é estabelecido pela U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) [110]. Importante salientar que estudos de toxicidade reportam que 10,69 e 5,6 μg L⁻¹ de cianeto livre são concentrações cronicamente tóxicas em águas potáveis e para a vida marinha, respectivamente [111]. Neste sentido, fazse necessário desenvolver procedimentos analíticos que atendam aos limites estabelecidos pela legislação.

Cianeto livre (CN⁻ e HCN) e a fração lábil (*e.g.* complexos formados com cobre, zinco ou prata) são extremamente tóxicos [86]. A determinação desta fração, chamada "cianeto dissociável em ácidos" (CDA), é mais importante que a de cianeto total porque os complexos estáveis e inertes (*e.g.* formados com ferro e cobalto) não são levados em consideração por não serem potencialmente tóxicos. O HCN da fração CDA pode ser liberado nos corpos d'água pela acidificação (pH < 4), diluição ou incidência de radiação UV. Com isto, esta fração indica o risco de contaminação dos ambientes aquáticos [86].

O CDA é determinado após a separação das espécies livres e lábeis pela adição de ácidos fortes diluídos, seguida de destilação [86,112,113] ou difusão gasosa [114 - 120,124]. A Associação de Saúde Pública Americana (APHA) recomenda o procedimento baseado na reação König [86], que envolve destilação. O HCN formado é coletado em uma solução aceptora alcalina, na forma de CN⁻. Este procedimento é sujeito a perdas de analito, além de ser altamente perigoso para o analista. O procedimento requer reagentes cromogênicos tóxicos (*e.g.* cloramina-T, ácido barbitúrico e piridina), usualmente em quantidades elevadas, sendo incompatível com os objetivos da Química limpa [121,122]. Apesar da tendência geral de diminuir o consumo de reagentes [122], um procedimento em fluxo para a determinação de cianeto utilizou ácido barbitúrico em concentração 48 vezes maior que o procedimento em batelada [123].

Outros procedimentos empregam digestão ácida assistida por radiação UV para liberar o CN⁻ ligado dos complexos [124,125]. Tanto a difusão gasosa, quanto a destilação possibilitam a separação de espécies potencialmente interferentes presentes na matriz,

exceto sulfeto, sulfito, nitrito e carbonato, que também formam espécies voláteis nas mesmas condições [111].

Após a separação, cianeto tem sido determinado por espectrofotometria [105,115, 118,123,126-128], fluorimetria [108,114,120,124], quimiluminescência [113,129,130], amperometria [116,125,131], potenciometria [132] ou microbalança com cristal piezoelétrico de quartzo [133], dentre outras alternativas. Procedimentos envolvendo cromatografia [134,135] ou eletroforese [136,137] também têm sido propostos; entretanto, alguns destes são demorados [134] ou empregam reagentes tóxicos após a separação do analito (*e.g.* N-cloro succinamida e ácidos isonicotínico e barbitúrico) [135].

Separação mediada por membranas pode ser eficientemente adaptada aos sistemas em fluxo. Tendo em vista que estes sistemas oferecem maior segurança ao analista por serem completamente fechados e permitirem a manipulação de pequenas alíquotas, com consequente redução do consumo de reagentes, têm sido usualmente adaptados à determinação de cianeto [121]. Neste sentido, microbombas solenoide [138] apresentam características intrínsecas (fluxo pulsado que favorece as condições de mistura e aumento da pressão no canal doador) que podem ser exploradas para aumentar a eficiência de difusão, minimizando o inconveniente da baixa transferência de massa, característica de processos de difusão gasosa.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um procedimento analítico limpo e altamente sensível para a determinação de cianeto dissociável em ácidos, explorando pioneiramente a difusão gasosa em sistema de análises em fluxo com multi-impulsão e espectrofotometria com longo caminho óptico. A determinação indireta de cianeto pela descoloração do complexo entre íons Cu(I) e ácido 2-2´-biquinolino-4,4´-dicarboxílico (BQA) também foi uma das inovações deste trabalho.

3.2. Experimental

3.2.1. Equipamentos e acessórios

O sistema de análises em fluxo com multi-impulsão foi construído com 5 microbombas solenoide (Biochem Valve) com volume nominal de 8 μ L (P₂ e P₃) e 10 μ L (P₁, P₄ e P₅); uma válvula solenoide de 3 vias (NResearch); tubos de polietileno (d.i. 0,8 mm) e conectores de acrílico. Todas as microbombas operaram a 5 Hz, exceto a P₄, que operou a 1 Hz durante a etapa de amostragem. Os dispositivos ativos foram controlados por um computador Pentium I equipado com uma interface paralela, construída empregando um circuito integrado (ULN2803) para a compatibilização da corrente. Uma fonte de 12 V foi utilizada para alimentação dos solenoides. O software para controle dos dispositivos foi desenvolvido em linguagem Visual Basic 6.0.

As medidas foram realizadas empregando um espectrofotômetro multicanal do tipo CCD (Ocean Optics, modelo USB2000) que consiste numa rede de difração com 600 linhas/mm com arranjo linear de 2048 fotodetectores. Cabos de fibra óptica foram usados para transportar a radiação da lâmpada de tungstênio-halogênio (Ocean Optics, modelo LS-1) para uma cela de fluxo de longo caminho óptico (Ocean Optics, modelo LPC) e desta para o espectrômetro. Para a aquisição de dados, foi utilizado o software do próprio fabricante (OOIBase32).

A unidade de difusão gasosa (UDG) foi construída no laboratório composta por duas peças de acrílico (10 cm x 2,8 cm x 4 cm) com sulcos simétricos (1,5 mm de profundidade, 1 mm de largura e 7 cm de comprimento) e tubos de polietileno acoplados para a entrada e saída dos fluidos. As peças de acrílico foram separadas por uma membrana hidrofóbica de Teflon[®] (Vedaflon, Brasil) obtida no comércio local. O conjunto foi unido por 4 parafusos.

3.2.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade > 18,0 M Ω cm) e reagentes de grau analítico. A solução estoque de BQA (sal dissódico do ácido 2-2'-biquinolino-4,4'-dicarboxílico, Sigma) 10 mmol L⁻¹ foi preparada em água e mantida sob

refrigeração. O reagente R₁ foi diariamente preparado pela diluição do estoque, contendo BQA 25,0 µmol L⁻¹ em acetato de amônio 0,4 mol L⁻¹ (Merck) em pH 7,0. O reagente R₂, constituído por Cu(II) 7,9 µmol L⁻¹ e ácido ascórbico 300 µmol L⁻¹ (Merck) foi armazenado em frasco escuro. Uma solução estoque de cianeto 1,0 g L⁻¹ (20,4 mmol L⁻¹ CN⁻) foi preparada a partir do sal NaCN (Merck) em NaOH 0,02 mol L⁻¹. A solução foi padronizada por titulação com nitrato de prata, usando iodeto como indicador [139]. Soluções de trabalho entre 5 e 200 µg L⁻¹ foram diariamente preparadas pela diluição do estoque em água. Uma solução de HCl 1,0 mol L⁻¹ (R₃) foi empregada como fluido doador na etapa de difusão gasosa e uma solução de NH₄OH 30 mmol L⁻¹ foi usada como solução transportadora da zona de amostra contendo o complexo [Cu(BQA)₂]³⁻. Os resíduos contendo cianeto foram coletados em solução de NaOH saturada.

As soluções de complexos metálicos de cianeto foram preparadas pela dissolução do sal correspondente ($K_4Fe(CN)_6$, $K_3Fe(CN)_6$ ou $K_3Co(CN)_6$) ou pela adição de quantidades de metal (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Ni^{2+} ou Hg^{2+}) à solução de cianeto, levando em consideração a proporção estequiométrica metal:cianeto (1:2, 1:3 ou 1:4). A concentração de cianeto foi equivalente a 50 µg L⁻¹ em todas as soluções.

Amostras de águas naturais foram coletadas em rios próximos à região de Piracicaba-SP, filtradas em membranas de acetato celulose 0,45 μ m e estocadas a 4 °C. As amostras foram estabilizadas à temperatura ambiente e adições de cianeto (25 ou 50 μ g L⁻¹) foram realizadas imediatamente antes das análises.

3.2.3. Procedimento

O módulo de análises do sistema em fluxo com multi-impulsão é mostrado na Figura 3.1.



Figura 3.1 - Sistema de análises em fluxo com multi-impulsão para a determinação de cianeto dissociável em ácidos. P_1 - P_5 : microbombas solenoide; C: solução transportadora (NH₄OH); R₁: BQA 25,0 µmol L⁻¹ + NH₄CH₃COO 0,4 mol L⁻¹ (pH 7,0); R₂: ácido ascórbico 300 µmol L⁻¹ + Cu(II) 7,9 mmol L⁻¹; R₃: HCl 1,0 mol L⁻¹; B₁,B₂: reatores (30 e 40 cm, respectivamente); A: amostra; V: válvula solenoide; M: membrana de PTFE; DET: cela de fluxo de 100 cm acoplada ao detector espectrofotométrico multicanal; UDG: unidade de difusão gasosa; D: recipiente de descarte

O procedimento operacional, descrito na Tabela 3.1, explorou a amostragem binária [18] para a manipulação das soluções de amostra e reagentes. O fluxo aceptor da espécie gasosa (HCN) foi formado com 4 ciclos dos reagentes R₁ e R₂ (etapas 1 e 2), misturados na bobina de reação B₁ (30 cm) e transportados até a parte superior da UDG (etapa 3). Em seguida, alíquotas das soluções de amostra (etapa 4) e HCl (etapa 5) foram intercaladas na bobina de reação B₂ (40 cm), sendo transportadas até a parte inferior da UDG (etapa 6). Durante esta etapa, a solução aceptora ficou parada na UDG a fim de coletar o HCN que difundiu através da membrana de PTFE. Em seguida, a zona de amostra foi transportada para a detecção espectrofométrica em 560 nm, etapa 7.

Para a substituição da amostra, a microbomba P_4 foi acionada e a solução foi removida da bobina B_2 pela solução de reagente R_3 (etapa 8). As medidas foram baseadas na altura do pico e realizadas em triplicata. Os sinais analíticos foram baseados na diferença dos sinais de absorbância entre a referência (medida somente com os reagentes R_1 e R_2) e aquele obtido na presença de cianeto, através da etapa da difusão gasosa.

Etapa	Descrição	Microbomba	Pulsos	Volume total (μ L)
1 ^{a,b}	Inserção de Cu(I)	P ₃	3	96
2 ^{a,b}	Inserção de BQA	P ₂	3	96
3 ^b	Transporte do aceptor para UDG	P ₁	15	150
4 ^c	Inserção de amostra	P ₄	12	1200
5 ^c	Inserção de HCl	P ₅	1	100
6	Transporte da zona de amostra	P ₅	15	150
7	Leitura do sinal	P ₁	130	1300
8	Substituição da amostra	P ₄	50	500
		P ₅	20	200

Tabela 3.1 - Rotina de acionamento dos dispositivos para a determinação de cianeto

 dissociável em ácidos

a: 4 ciclos de amostragem; b: Válvula solenoide V acionada; c: Microbombas ativadas em 1 Hz e 10 ciclos de amostragem

3.2.4. Procedimento de referência

O procedimento de referência foi baseado na fluorescência do produto da reação entre cianeto, *o*-ftalaldeído e glicina. O isoindol fluorescente foi formado em fluxo, utilizando 500 μL de amostra e separação por difusão gasosa (máximo de excitação em 330 nm e de emissão em 380 nm). A propulsão dos fluidos foi realizada com bomba peristáltica empregando as vazões definidas no procedimento de referência [114].

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Aspectos gerais

A determinação de cianeto foi baseada na reação de descoloração do complexo formado entre íons Cu(I) e ácido 2,2'-biquinolino 4,4'-dicarboxílico. O complexo, cuja formação é termodinamicamente favorável (K_f = 4,6 x 10^{14}), apresenta máximos de absorção em 357 e 560 nm (Figura 3.2). As absortividades molares foram estimadas em 4,2x 10^4 L mol⁻¹ cm⁻¹ (357 nm) e 7,7x 10^3 L mol⁻¹ cm⁻¹ (560 nm) [140]. Apesar do primeiro comprimento de onda apresentar maior absortividade, optou-se por trabalhar em 560 nm,

por encontrar-se na região visível e ser mais adequado para a medida com a lâmpada de tungstênio-halogênio.

A descoloração do complexo púrpura $[Cu(BQA)_2]^{3-}$, na presença de cianeto na zona de amostra, ocorre devido ao complexo formado com os íons cobre ($[Cu(CN)_2]^{-}$) que permite a quantificação indireta do analito. A formação do complexo é rápida e termodinamicamente favorecida ($K_f = 1,0 \times 10^{24}$).



Figura 3.2 - Espectros de absorção do complexo $[Cu(BQA)_2]^{3-}$ antes (a) e após (b) reação com 200 µg L⁻¹ CN⁻. Condições: BQA 25 µmol L⁻¹; NH₄CH₃COO 0,4 mol L⁻¹ (pH 7,0); ácido ascórbico 300 µmol L⁻¹; transportador: NH₄OH 30 mmol L⁻¹

Um estudo cinético referente à formação do complexo $[Cu(BQA)_2]^{3-}$ é apresentado na Figura 3.3. O estudo foi realizado com a mistura em fluxo dos reagentes R₁ (BQA 25 µmol L⁻¹ em acetato de amônio) e R₂ (Cu(II) 7,9 µmol L⁻¹ na presença de ácido ascórbico 300 µmol L⁻¹). O primeiro pico na Figura 3.3 refere-se à resposta da solução de referência sem a parada de fluxo e, no segundo pico, o fluxo foi interrompido com a zona de amostra na cela de fluxo, sendo o produto da reação monitorado por 20 min. Observa-se que a reação entre Cu(I) e BQA ocorre imediatamente após a mistura dos reagentes e o produto permanece estável por período muito superior ao tempo de residência no sistema de análises em fluxo. Este aspecto permitiu explorar o próprio complexo como aceptor para fixação de HCN. Na configuração proposta, o aceptor ficou retido na parte superior da UDG durante a etapa de amostragem, para a retenção do HCN liberado durante a difusão. Desta forma, foi possível explorar uma etapa de enriquecimento do analito durante a difusão pelo emprego de maior volume de amostra.



Figura 3.3 - Estudo cinético da reação entre Cu(I) e BQA. Respostas da referência antes (a) e após (b) a interrupção do fluxo. Condições: BQA 25 μ mol L⁻¹; NH₄CH₃COO 0,4 mol L⁻¹ (pH 7,0); ácido ascórbico 300 μ mol L⁻¹; transportador: NH₄OH 30 mmol L⁻¹

A câmara de difusão gasosa empregada foi construída conforme descrito na literatura [141]. A UDG permite que os fluxos (doador e aceptor) sejam separados por uma membrana hidrofóbica. Com isto, somente as espécies gasosas difundem pela membrana, possibilitando a separação do analito das demais espécies constituintes da matriz que poderiam interferir na determinação de cianeto. Esta separação também viabiliza a determinação de CDA, uma vez que somente as espécies convertidas a HCN em meio de HCl diluído serão quantificadas.

Microbombas solenoide foram empregadas para inserção e transporte das soluções. O movimento caótico gerado por estes dispositivos foi explorado para favorecer as condições de mistura e promover um aumento momentâneo da pressão no canal doador favorecendo a difusão do HCN. Além disso, os sistemas em fluxo com multi-impulsão permitem o gerenciamento independente das soluções doadora e aceptora, aspecto explorado para manter a solução aceptora estagnada durante a difusão gasosa. Espectrofotometria com longo caminho óptico (ELC) foi explorada para aumentar a sensibilidade do procedimento, uma vez que um maior número de espécies absorventes poderão interagir com o feixe de radiação e, portanto, pode-se utilizar menor concentração do complexo, favorecendo a descoloração mesmo na presença de baixas concentrações de cianeto. Esta é a primeira aplicação da ELC em um procedimento baseado em descolorimetria.

Algumas reações simultâneas devem ocorrer durante o procedimento (formação do complexo ([Cu(BQA)₂]³⁻), geração de HCN e descoloração do complexo pela formação da espécie ([Cu(CN)₂]⁻)). O comprimento dos percursos analíticos foram definidos visando a mistura adequada dos reagentes e o desenvolvimento das reações que, conforme discutido anteriormente, são rápidas. Os comprimentos dos reatores foram, então, escolhidos como um compromisso entre a frequência de amostragem e o tempo de residência da amostra, além de minimizar a contra-pressão, já incrementada pelo uso da cela de longo caminho óptico de dimensões capilares. Com isto, foi possível acoplar dois dispositivos fundamentais para o desenvolvimento deste procedimento, *i.e.* a cela de longo caminho óptico (para aumento de sensibilidade) e a UDG (para a melhoria de seletividade).

Na configuração proposta, a UDG e a cela de longo caminho óptico foram posicionadas em série e, assim, a etapa de amostragem da solução aceptora poderia ser afetada pelo aumento da contra-pressão. Uma válvula solenoide foi, então, posicionada entre os dispositivos para evitar esse inconveniente pelo acionamento durante a amostragem do aceptor (Figura 3.1). Observou-se que o sinal analítico aumentou em 7 % na presença da válvula (V) em função da redução da contra-pressão. Além disso, a válvula foi acionada quando as soluções (C, R₁ e R₂) foram substituídas, evitando que estas fossem transportadas através da cela de medida, minimizando os riscos de contaminação e diminuindo o tempo de limpeza.

Apesar da difusão gasosa ser muito empregada na separação de espécies voláteis, mesmo em condições ótimas, apenas 5 a 20 % das espécies gasosas difundem pela membrana hidrofóbica [85]. Dessa forma, as alternativas mencionadas anteriormente (microbombas para transporte das soluções, aumento da pressão momentânea no doador, emprego de válvula para minimizar a contra-pressão) foram estrategicamente exploradas para aumentar a transferência de massa que é fundamental em procedimentos visando alta sensibilidade. Neste sentido, a membrana de PTFE foi selecionada por apresentar a menor espessura dentre as disponíveis, favorecendo a transferência gasosa.

3.3.2. Otimização

A otimização do procedimento foi realizada pelo método univariado, com respostas em triplicata, considerando a magnitude do sinal de referência (complexo [Cu(BQA)₂]³⁻) e sua diminuição devido à difusão do HCN gerado em fluxo.

Nos primeiros estudos, realizados na ausência da câmara de difusão, foram definidas as condições apropriadas para a formação dos complexos $[Cu(BQA)_2]^{3-}$ e $[Cu(CN)_2]^{-}$. A zona de amostra foi inicialmente formada por 6 ciclos de amostragem com 3 pulsos de cada reagente (R₁: BQA em meio de acetato de amônio e R₂: Cu(II)), além de ácido ascórbico e amostra. Para as duas últimas soluções foram empregadas duas microbombas que dispensavam volumes de 13 µL e 7 µL, respectivamente.

A concentração de cobre para a formação do complexo $[Cu(BQA)_2]^{3-}$ foi o primeiro parâmetro avaliado (Figura 3.4). O sinal analítico aumentou com a concentração de cobre devido à presença de BQA em excesso no meio reacional. Entretanto, a concentração de cobre é um parâmetro que afeta diretamente a sensibilidade do procedimento, bem como a faixa de resposta. Elevadas concentrações deste íon poderiam prejudicar a reação de descoloração, com perda de sensibilidade, uma vez que quantidades mínimas de cianeto não seriam detectadas. Por outro lado, em concentrações muito baixas de cobre, haveria formação de complexos com BQA em menores quantidades, que poderiam ser completamente descoloridos na presença de cianeto, consequentemente limitando a faixa de resposta. Dessa forma, a concentração de 7,9 µmol L⁻¹ cobre foi selecionada como um compromisso entre a sensibilidade e a faixa de resposta para determinação do analito e também para definir um sinal de referência que minimizasse o erro nas medidas espectrofotométricas. Além disso, na Figura 3.4 pode-se visualizar que a concentração 7,9 µmol L⁻¹ de cobre foi a que apresentou maior descoloração (o sinal analítico foi no mínimo 20% maior em relação às outras concentrações).



Figura 3.4 - Efeito da concentração de cobre sobre os sinais de referência (a) e obtidos na presença de CN⁻ 100 µg L⁻¹ (b). Condições: BQA 25 µmol L⁻¹; NH₄CH₃COO 0,4 mol L⁻¹ (pH 7,0); ácido ascórbico 300 µmol L⁻¹; transportador: NH₄OH 30 mmol L⁻¹

Cu(II) livre pode formar complexos insolúveis com BQA [140,142], afetando a sensibilidade e provocando deriva da linha de base. Dessa forma, uma solução de NH₄OH foi usada como transportador e o reagente R₁ foi preparado em meio de acetato de amônio, com a finalidade de oferecer NH_{3(aq)} e íons acetato livres no meio reacional para formarem os complexos solúveis, evitando a precipitação. As constantes de formação dos complexos $[Cu(NH_3)_4]^{2+}$ (K_f = 1,07 x 10¹²) e $[Cu(CH_3COO)_2]$ (K_f = 4,2 x 10³) são menores que aquelas referentes aos complexos $[Cu(BQA)_2]^{3-}$ e $[Cu(CN)_2]^{-}$, não afetando o procedimento analítico.

O efeito da concentração de ácido ascórbico foi avaliado entre 100 e 1200 μ mol L⁻¹ e, devido ao excesso em relação ao Cu(II), não houve variação significativa nos sinais analíticos. Optou-se por empregar 300 μ mol L⁻¹ do redutor, a fim de evitar a oxidação de Cu(I) pelo

oxigênio dissolvido na solução e aumentar o tempo de vida do reagente. Uma vez observado que as respostas foram semelhantes tanto para a inserção de ácido ascórbico diretamente na zona de amostra, quanto para o reagente Cu(II) preparado na presença do redutor, a segunda alternativa foi selecionada para evitar o uso de uma microbomba adicional.

Para a avaliação do efeito da concentração de BQA sobre os sinais analíticos (Figura 3.5), o reagente (R₁) foi preparado em meio de acetato de amônio 400 mmol L⁻¹ (pH 7,0) e o R₂ continha Cu(I) 7,9 µmol L⁻¹ e ácido ascórbico 300 mmol L⁻¹. A resposta da referência ficou constante a partir de 25 µmol L⁻¹ devido ao excesso de ligante para reação com Cu(I). Esta concentração equivale a aproximadamente três vezes a concentração de cobre no meio reacional, sendo a proporção um pouco maior que a estequiométrica (1:2). Trabalhos prévios, que aplicaram esta reação para a determinação de taninos em bebidas [140] e ácido úrico em urina [142] empregaram concentrações de BQA semelhantes a este procedimento (proporção Cu(II):BQA (1:3)). A presença de ligante em excesso assegura as condições para a formação do complexo, em virtude da elevada constante de formação (item 3.3.1).



Figura 3.5 - Efeito da concentração de BQA sobre os sinais da referência (a) e obtidos na presença de CN^{-1} 100 µg L^{-1} (b). Condições: NH_4CH_3COO 0,4 mol L^{-1} (pH 7,0); ácido ascórbico 300 µmol L^{-1} ; transportador: NH_4OH 30 mmol L^{-1}

Acetato de amônio foi empregado para ajuste do pH em 7,0, objetivando a condição adequada para formação do complexo $[Cu(BQA)_2]^{3-}$ [140], além de proporcionar espécies livres que formam complexos solúveis com Cu(II), pelas razões mencionadas anteriormente. Conforme mostrado na Figura 3.6, não foi observada variação significativa nos sinais de referência e analítico quando a concentração de NH₄CH₃COO foi variada entre 0,2 e 1,2 mol L⁻¹. Desta forma, optou-se por trabalhar com 0,4 mol L⁻¹ de acetato de amônio a fim de evitar a variação do pH para a fixação de HCN.



Figura 3.6 - Efeito da concentração de NH_4CH_3COO sobre os sinais de referência (a) e obtidos na presença de CN^- 100 µg L^{-1} (b). Condições: BQA 25 µmol L^{-1} ; ácido ascórbico 300 µmol L^{-1} ; transportador: NH_4OH 30 mmol L^{-1}

A ordem de inserção dos reagentes foi avaliada uma vez que várias reações simultâneas ocorrem no meio reacional (Tabela 3.2). Nas condições I e II, supõe-se prévia complexação de cobre com cianeto e que o ligante (BQA) complexou o cobre livre. Na condição III, diferente das anteriores, supõe-se que ocorreu a descoloração do complexo. Os resultados indicam que maior resposta (*ca.* 15%) foi obtida na condição que favorece a formação do complexo [Cu(BQA)₂]³⁻ previamente à reação com cianeto (condição III). Desta forma, a solução do complexo pode ser utilizada como aceptora do HCN que difunde pela membrana.

Ordem	Reagentes	Sinal analítico*
I	Cu(I)/amostra/BQA	$\textbf{0,}\textbf{42}\pm\textbf{0,}\textbf{02}$
П	Amostra/Cu(I)/BQA	$0,42\pm0,01$
Ш	Cu(I)/BQA/amostra	$\textbf{0,}49\pm\textbf{0,}02$

Tabela 3.2 - Ordem de inserção de amostra e reagentes na zona de amostra

* diferença entre o sinal de referência e aquele medido na presença de cianeto

O número de ciclos de amostragem (*i.e.* número de repetições da sequência $R_1 e R_2$) para formação do aceptor foi avaliado (entre 1 e 12 ciclos), utilizando 3 pulsos de cada reagente em cada ciclo. Não houve diferença significativa no sinal analítico a partir de 4 ciclos, indicando que a condição de volume infinito foi alcançada.

O efeito da acidez no fluxo aceptor foi avaliado mantendo as condições estabelecidas nos estudos anteriores e observou-se que o sinal analítico tendeu a aumentar com menor acidez (pH = 9,0), Figura 3.7.



Figura 3.7 - Efeito do pH da solução aceptora sobre os sinais da referência (a) e obtidos na presença de CN⁻ 100 µg L⁻¹ (b). Condições: BQA 25 µmol L⁻¹; NH₄CH₃COO 0,4 mol L⁻¹ (pH 7,0); ácido ascórbico 300 µmol L⁻¹; transportador: NH₄OH 30 mmol L⁻¹

Este aumento ocorre devido à melhor fixação de HCN em meio alcalino, conforme se observa no diagrama de distribuição do HCN (Figura 3.8). A partir de pH 9,0 ocorre hidrólise do metal, com decréscimo acentuado do sinal de referência. Apesar da maior resposta em pH 9,0, optou-se por trabalhar em pH 7,0 como estratégia para evitar a hidrólise metálica e especialmente minimizar a interferência de sulfeto, cuja fixação no aceptor requer pH mais elevado (pK_{a2} H₂S = 13,8).



Figura 3.8 - Diagrama de distribuição das espécies HCN e CN⁻ em função do pH (pK_{HCN} = 9,2)

Uma vez que a proposta do trabalho é a determinação da fração CDA, a próxima etapa foi acoplar a câmara de difusão gasosa ao módulo de análises. Alguns parâmetros como a configuração da UDG, vazão e o aumento momentâneo da pressão no canal doador foram avaliados para aumentar a eficiência de difusão e, consequentemente, a sensibilidade. A primeira estratégia adotada foi ajustar a membrana hidrofóbica posicionando-a levemente estirada a fim de diminuir parcialmente a espessura. Entretanto, este estiramento deve ser realizado com cuidado para não romper a membrana. Tanto o fluxo direto (ambas as soluções fluindo no mesmo sentido) quanto o fluxo inverso (contra-fluxo) entre as soluções doadora e aceptora foram avaliados, sendo observada maior difusão em contra-fluxo (*ca.* 60% maior). Este comportamento está relacionado com o gradiente de concentração do gás na solução, que pode variar com o sentido do fluxo, uma vez que o HCN tem que ser formado em linha, difundir pela membrana e ser fixado no aceptor.

O fluxo pulsado gerado pelas microbombas solenoide aumenta momentaneamente a pressão no canal doador, favorecendo o desprendimento de gases e a difusão de HCN. Na literatura é mencionado que a geometria da câmara de difusão em espiral proporciona um movimento turbulento e aumento de pressão, favorecendo a difusão [85]. Entretanto, efeito oposto seria esperado no canal aceptor [85], sendo este um dos motivos para ter sido explorada a parada de fluxo no aceptor na etapa de difusão.

O efeito da vazão sobre o sinal analítico é apresentado na Figura 3.9. A vazão foi variada alterando a frequência de pulsação da microbomba da amostra pelo *software* de controle. Pela Figura 3.9 observa-se que o sinal analítico aumentou 33% quando a vazão da amostra diminuiu de 5 para 1 Hz durante a etapa de amostragem (equivalente a vazões de 3 e 0,6 mL min⁻¹, respectivamente). Isto se deve ao maior tempo de residência da zona de amostra (fluxo doador) em contato com a membrana de PTFE, favorecendo a difusão. Este resultado é coerente com o reportado na literatura [85]. O efeito da vazão do fluxo aceptor foi também avaliado, mas não foi observada diferença significativa nas respostas.



Figura 3.9 - Efeito da vazão sobre os sinais de referência (a) e obtidos na presença de CN⁻ 100 µg L⁻¹ (b). Condições: BQA 25 µmol L⁻¹; NH₄CH₃COO 0,4 mol L⁻¹ (pH 7,0); ácido ascórbico 300 µmol L⁻¹; transportador: NH₄OH 30 mmol L⁻¹

Visando maiores transferências de massa, as condições experimentais do doador foram avaliadas empregando diversos ácidos minerais (HCl, HNO₃ e H_2SO_4) contendo a mesma concentração de H_3O^+ como fonte de prótons para geração de HCN (Figura 3.10).

Como a variação nas respostas foi menor que 2%, HCl foi selecionado por ser de fácil aquisição e menor custo, além de já ter sido empregado em procedimentos que utilizam difusão gasosa de cianeto [114,115,116,118,120].



Figura 3.10 - Efeito do tipo de ácido na geração de HCN sobre os sinais de referência (a) e obtidos na presença de CN⁻ 100 µg L⁻¹ (b). (I) HNO₃ 1,0 mol L⁻¹; (II) H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ e (III) HCl 1,0 mol L⁻¹. Condições: BQA 25 µmol L⁻¹; NH₄CH₃COO 0,4 mol L⁻¹ (pH 7,0); ácido ascórbico 300 µmol L⁻¹; transportador: NH₄OH 30 mmol L⁻¹

Outras soluções foram avaliadas como aceptoras de HCN e os resultados estão apresentados na Figura 3.11. NH₄OH (30 mmol L⁻¹), NaOH (20 mmol L⁻¹) e o próprio complexo [Cu(BQA)₂]³⁻ formado em fluxo (R₁ + R₂) foram avaliados objetivando maximizar a fixação de cianeto. Para tanto, uma alteração do módulo de análises foi requerida e consistiu em posicionar a UDG diretamente no transportador, de modo a preencher toda a parte superior da câmara com o aceptor em estudo, antes da inserção dos reagentes na bobina (B₁). Nesta configuração, os reagentes eram inseridos logo após a câmara, por amostragem binária com o aceptor. Quando o aceptor foi a solução de NaOH, o sinal da referência foi três vezes menor devido à hidrólise de cobre, o que dificultou a formação do complexo ([Cu(BQA)₂]³⁻). Por outro lado, quando NH₄OH e o próprio complexo [Cu(BQA)₂]³⁻ formado em fluxo foram empregados como aceptores, observou-se que os sinais analíticos não foram significativamente diferentes (Figura 3.11).



Figura 3.11 - Efeito do aceptor para fixação do HCN sobre os sinais de referência (a) e obtidos na presença de CN⁻ 100 μ g L⁻¹ (b). Aceptores: (I) Complexo [Cu(BQA)₂]³⁻; (II) NH₄OH 30 mol L⁻¹ e (III) NaOH 20 mmol L⁻¹. Condições: BQA 25 μ mol L⁻¹; NH₄CH₃COO 0,4 mol L⁻¹ (pH 7,0); ácido ascórbico 300 μ mol L⁻¹; transportador: NH₄OH 30 mmol L⁻¹

Diversas concentrações de NH₄OH foram avaliadas visando a maior fixação de HCN (Figura 3.12). Entretanto, não foi observada melhora significativa do sinal em relação ao uso do complexo [Cu(BQA)₂]³⁻ como aceptor. Desta forma, a solução do complexo foi utilizada como aceptora, simplificando o módulo de análises.



Figura 3.12 - Efeito da concentração de NH₄OH como aceptor de HCN sobre os sinais de referência (a) e obtidos na presença de CN⁻ 100 μ g L⁻¹ (b). Condições: BQA 25 μ mol L⁻¹; NH₄CH₃COO 0,4 mol L⁻¹ (pH 7,0); ácido ascórbico 300 μ mol L⁻¹; transportador: NH₄OH 30 mmol L⁻¹

O efeito da fração volumétrica amostra:HCl foi avaliado e as respostas são apresentadas na Figura 3.13. Considerando que HCl foi usado em largo excesso, o aumento da fração volumétrica de amostra promoveu maior quantidade de HCN liberado e, consequentemente, maior descoloração do complexo [Cu(BQA)₂]³⁻.

A etapa de amostragem pode ser explorada para promover o enriquecimento do analito [114]. O aumento da descoloração do complexo, observado na Figura 3.13 indica a boa mistura das soluções no fluxo doador, mesmo quando volumes elevados de amostra foram utilizados. A proporção selecionada foi de 12 pulsos de amostra para 1 pulso de HCI a cada ciclo de amostragem, como um compromisso entre sensibilidade e frequência de amostragem. Após a zona de amostra ter sido formada, o próprio HCI foi empregado como transportador do doador para acentuar a formação de HCN e evitar o uso de uma solução adicional.



Figura 3.13 - Efeito da fração volumétrica sobre os sinais de referência (a) e obtidos na presença de CN^{-} 100 µg L^{-1} (b). Condições: BQA 25 µmol L^{-1} ; NH₄CH₃COO 0,4 mol L^{-1} (pH 7,0); ácido ascórbico 300 µmol L^{-1} ; transportador: NH₄OH 30 mmol L^{-1}

O mesmo comportamento descrito anteriormente deveria ser observado alterando o número de ciclos de amostragem, devido ao aumento da massa de cianeto no fluxo doador.

Os resultados referentes à avaliação do efeito deste parâmetro estão apresentados na Figura 3.14. Como não houve diferença significativa nas respostas na faixa avaliada (5 a 15 ciclos de amostragem), 10 ciclos de amostragem foram selecionados como um compromisso entre sensibilidade e frequência de amostragem. Este resultado é consequência da baixa eficiência de difusão, ou seja, como somente uma pequena fração difunde pela membrana, não se observa um efeito significativo com o aumento da massa de analito no fluxo doador.



Figura 3.14 - Efeito do número de ciclos de amostragem sobre os sinais de referência (a) e obtidos na presença de CN⁻ 100 μ g L⁻¹ (b). Condições: BQA 25 μ mol L⁻¹; NH₄CH₃COO 0,4 mol L⁻¹ (pH 7,0); ácido ascórbico 300 μ mol L⁻¹; transportador: NH₄OH 30 mmol L⁻¹; proporção amostra:HCl 12:1

Um resumo das variáveis otimizadas, o intervalo de estudo e os valores selecionados para cada parâmetro de interesse na determinação de CDA em águas naturais é apresentado na Tabela 3.3.

Parâmetro	Intervalo	Valor selecionado
Concentração de cobre (µmol L ⁻¹)	1,6 – 15,7	7,9
Concentração de ácido ascórbico (µmol L ⁻¹)	100 - 1200	300
Concentração de BQA (µmol L ⁻¹)	10 - 100	25
Concentração de NH ₄ CH ₃ COO (mmol L ⁻¹)	200 - 1200	400
pH do tampão	5,0 - 10,0	7,0
Pulsos de R ₁	1 – 18	3
Pulsos de R ₂	1 – 20	3
Pulsos de R₃	1-5	1
Pulsos de amostra	1 – 20	12
Frequência do pulso de amostra (Hz)	1-5	1
Ciclos de amostragem (aceptor)	1 – 12	4
Ciclos de amostragem (doador)	1 – 15	10

Tabela 3.3 - Parâmetros otimizados para a determinação de cianeto dissociável em ácidos

3.4. Características analíticas e aplicação

Nas condições otimizadas (Tabela 3.3), o procedimento apresentou resposta linear de 5 a 200 μ g L⁻¹, descrita pela equação A = (5,25 ± 0,73) x 10⁻² + (2,11 ± 0,07) x 10⁻³ C_{CN}⁻¹ (r = 0,999) e os sinais transientes e a respectiva curva analítica são apresentados na Figura 3.15. Os sinais transientes indicam a estabilidade da linha de base e ausência de efeito de memória nas determinações. O coeficiente de variação (n = 10) e a frequência de amostragem foram estimados em 1,5 % e 22 determinações h⁻¹. O limite de detecção (2,0 μ g L⁻¹) foi determinado experimentalmente pela comparação dos valores de absorbância medidos na presença e ausência da amostra. A estratégia explorada foi identificar a menor concentração de cianeto que produzisse um sinal de absorbância significativamente diferente da referência com 95 % de confiança (comparação de médias usando teste t).



Figura 3.15 - Sinais transientes e curva analítica para a determinação de CDA no sistema de análises em fluxo com multi-impulsão. As condições empregadas são descritas na legenda da Figura 3.1 e na Tabela 3.3. Os números sobre os sinais transientes indicam concentrações de cianeto em μ g L⁻¹ e Rs corresponde ao sinal de referência

O procedimento consumiu somente 48,0 ng de Cu(II), 5,0 µg de ácido ascórbico e 0,9 µg de BQA por determinação. Uma comparação das características analíticas com as obtidas em outros procedimentos para a determinação de cianeto é apresentada na Tabela 3.4. Verifica-se que o procedimento proposto apresentou um dos mais baixos limites de detecção (compatível com os limites estabelecidos pelas normas ambientais) combinado com uma das mais altas frequências de amostragem entre os procedimentos que empregam difusão gasosa em linha.

Nos procedimentos desenvolvidos publicados na literatura (Tabela 3.4), menores limites de detecção foram obtidos com prejuízo da frequência de amostragem [114,116] em virtude do longo tempo requerido na etapa de difusão para enriquecimento do analito. Em outros procedimentos, ao contrário, maiores frequências de amostragem foram alcançadas às custas de menor sensibilidade [112,120,129] ou são procedimentos limitados para a determinação apenas de cianeto livre [108,123,126,143,144], ou seja, sem a etapa de difusão gasosa. Além disso, os procedimentos que empregam a separação
off-line da fração CDA [112,120,130] colocam em risco a segurança do analista e aumentam os riscos de erros. A maioria dos procedimentos mencionados nesta Tabela requer reagentes altamente tóxicos (*e.g.* nihidrina e ácido barbitúrico) e geram elevadas quantidades de resíduos, as quais são consideravelmente maiores que as gerados neste procedimento [86,115,143].

Tabela 3.4 - Características analíticas dos procedimentos em fluxo para a determinação de cianeto em águas naturais ou residuais

Procedimento	Reagente	Separação de HCN	FR (µg L ⁻¹)	רם (µg L ⁻¹)	FA (h ⁻¹)	Referência
FIA-fluorescência	Complexo cobre-calceína	Não empregada	<5200	13	10	108
FIA-espectrofotometria	Ácido aquacianobirínico heptametil ester	Destilação	400-5200	250	30	112
FIA-fluorescência	o-ftalaldeído e glicina	On-line	<200	0,5	10	114
FIA-espectrofotometria	Isonicotinato-3-metil-1-fenil-2-pirazolina-5-ona	On-line	< 1000	ε	20	115
SIA-amperometria	I	On-line	0,17-70	0,05	e	116
SIA-espectrofotometria	Nihidrina	On-line	7,5-200	2,5	∞	118
MCFA-fluorescência	o-ftalaldeído e glicina	Off-line	1-200	0,5	22	120
FIA-espectrofotometria	Piridina, ácido barbitúrico e cloramina T	Não empregada	< 4000	20	60	123
FIA-espectrofotometria	Fenolftaleína	Não empregada	600-4300	100	70	126
FIA-quimiluminescência	Rodanase-sulfito oxidase, sulfeto, peroxidase, luminol	Não empregada	3-100	0,3	30 ^a	129
FIA-quimiluminescência	Cobre, luminol, NaCl	Destilação	5-2000	2	60 ^a	130
FIA-amperometria	Saccharomyces cerevisae	Não empregada	26-390	4	9	131
FIA-potenciometria	[Co(II)bqb]	Não empregada	<26000	130	200	132
FIA-piazoelétrico	Au/NaOH	Não empregada	100-2000	16, 1	9	133
FIA-FAAS	CdCO ₃	Não empregada	<15000	200	72	143
FIA-FAAS	Ag(I) imobilizada em fase sólida	Não empregada	100 - 10000	60		144
MDES. Esnectrofotomotria		On-line	5_200	ç	"	Este
				V	77	trabalho

FR: faixa de resposta; LD: limite de detecção; FA: frequência de amostragem; bqb: bis(2-quino-linocarboxamido)-1,2-benzeno. ªsem considerar a etapa de separacão de HCN.

Estudos de recuperação de cianeto de diferentes complexos metálicos foram realizados (Tabela 3.5). Completa recuperação foi encontrada nos complexos lábeis formados com Cu(II), Cd(II), Ag(I) e Zn(II) e baixos valores de recuperação foram encontrados com Ni(II) (32%) e Co(II) (26%), uma vez que os complexos são relativamente inertes. O cianeto ligado a complexos inertes e estáveis (*e.g.* Fe(CN)₆⁴⁻ e Fe(CN)₆³⁻) não foi detectado. Estes resultados são coerentes com os encontrados na literatura [114], mostrando que o procedimento proposto é uma boa alternativa para a determinação de CDA.

Espécies	Rec	cuperação (%)
(50 µg L ⁻¹ de CN ⁻)	Procedimento proposto	Procedimento de referência [114]
Cu ²⁺ (1:3)	100	101
Cd ²⁺ (1:4)	101	97
Ag ⁺ (1:2)	107	100
Zn ²⁺ (1:4)	105	98
Ni ²⁺ (1:4)	32	20
Co(CN) ₆ ³⁻	26	0
Fe(CN) ₆ ³⁻	0	0
Fe(CN) ₆ ⁴⁻	4	0
Hg ²⁺ (1:2)	72	99
Hg ²⁺ (1:4)	78	102

Tabela 3.5 - Recuperações de CDA em complexos metálicos. Números entre parêntesesindicam a razão molar entre metal e cianeto

A única discrepância foi observada com os complexos de Hg(II). Para a recuperação quantitativa de cianeto em complexos com estes metais é recomendada a adição de ditizona ou tetraetilenopentano à amostra, para formação de complexos mais estáveis devido à troca de ligantes [86,111,114]. Os resultados obtidos no procedimento proposto são coerentes com o observado em trabalho anterior [111] que compara três procedimentos para a

determinação de CDA. Neste trabalho, reporta-se que é esperada a recuperação incompleta de cianeto ligado a níquel e mercúrio, especialmente quando os complexos estão em maiores concentrações. Entretanto, somente quantidades traços destas espécies são usualmente encontradas em amostras de águas naturais. Os complexos formados com ferro são menos tóxicos e não deveriam ser dissociados em ácidos diluídos e este comportamento foi observado tanto no procedimento proposto, quanto no de referência (recuperação < 5%) [114]. O mesmo comportamento é relatado na literatura [111].

Sulfeto é usualmente o principal interferente na determinação de CDA em águas porque H₂S pode ser gerado nas mesmas condições operacionais e difundir pela membrana de PTFE. No procedimento proposto, sulfeto pode competir com cianeto pela formação de complexo com cobre. Este efeito foi avaliado com soluções de cianeto (50 μ g L⁻¹) contendo de 5 a 50 μ g L⁻¹ de S²⁻ (Figura 3.16). Os resultados apresentados indicam que, na presença de até 40 μ g L⁻¹ de S²⁻, as diferenças nas respostas em relação à solução de cianeto foram menores que 5%. Nas condições avaliadas, somente com 50 μ g L⁻¹ de S²⁻ (Figura 3.16-g) houve uma redução de 7% na resposta em relação à observada na ausência do interferente (Figura 3.16-a).



Figura 3.16 - Efeito da concentração de sulfeto sobre o sinal de absorbância de 50 μ g L⁻¹ de CN⁻. Valores de absorbância medidos na ausência de sulfeto (a) e na presença de 5 μ g L⁻¹ (b); 10 μ g L⁻¹ (c); 20 μ g L⁻¹ (d); 30 μ g L⁻¹ (e); 40 μ g L⁻¹ (f) e 50 μ g L⁻¹ (g) de sulfeto. Condições: BQA 25 μ mol L⁻¹; NH₄CH₃COO 0,4 mol L⁻¹ (pH 7,0); ácido ascórbico 300 μ mol L⁻¹; transportador: NH₄OH 30 mmol L⁻¹

Foi verificado experimentalmente que um tratamento da amostra pela adição de H₂O₂ evitou a interferência de sulfeto pela oxidação a sulfato (Eq. 4.1). Com isto, a formação do gás (H₂S) que poderia difundir pela membrana seria evitada.

$$S^{2^{-}} + 4 H_2O_2 \rightarrow SO_4^{2^{-}} + 4 H_2O$$
 (Eq. 4.1)

Para este estudo, a descoloração que ocorre numa solução de CN- (50 μ g L⁻¹) foi comparada àquela observada na presença de CN⁻ (50 μ g L⁻¹) + S²⁻ (com 200 μ g L⁻¹) visando determinar o volume de peróxido suficiente para suprimir a interferência (Figura 3.17). Observa-se a redução gradual (de 17% para 3% nas respostas b,c,d,e) da interferência de S²⁻ pela adição de H₂O₂ até 125 μ L. Desta forma, optou-se por utilizar 125 μ L H₂O₂ (concentração final equivalente a 1,6 mmol L⁻¹), levando em consideração que 200 μ g L⁻¹ de S²⁻ é uma concentração consideravelmente maior que a esperada em amostras de águas naturais (a concentração limite estabelecida pela legislação ambiental é de 2 μ g L⁻¹ H₂S [109]).



Figura 3.17 - Efeito da adição de H_2O_2 sobre a interferência de sulfeto. Soluções contendo $CN^- 50 \ \mu g$ $L^{-1} CN^-$ (a) ou $CN^- 50 \ \mu g \ L^{-1} + S^{2-} 200 \ \mu g \ L^{-1}$ (b-f). Medidas após a adição de 0 μ L (b); 25 μ L (c); 50 μ L (d); 100 μ L (e) e 125 μ L (f) de H_2O_2 (30% v/v)

Outra estratégia para a remoção da interferência de sulfeto consiste na adição de um íon metálico que forme complexo lábil com CN^- (*e.g.* Cu(II)) para a formação de espécies estáveis com o interferente (Kps_(CuS) = 36,1), consequentemente, suprimindo a liberação de H₂S. Para avaliar a viabilidade da proposta, um estudo foi realizado empregando uma solução 50 µg L⁻¹ de cianeto contendo 200 µg L⁻¹ de S²⁻ e adição de 125 µL de H₂O₂ comparada à adição de 130 µg L⁻¹ de Cu(II) nas mesmas condições. A descoloração de 50 µg L⁻¹ de cianeto apresentou 0,926 como resposta em absorbância. A resposta da adição de 130 µg L⁻¹ de cobre na amostra suprimiu a interferência de 200 µg L⁻¹ de S²⁻ (diferença inferior a 1,4% em relação à resposta na ausência do interferente) semelhante ao observado com a adição de peróxido.

O efeito da concentração de cobre para evitar a formação de H₂S foi avaliado até 260 μg L⁻¹, sem afetar o sinal analítico. Entretanto, acima desta concentração, observou-se interferência negativa causando supressão nas respostas devido à competição de cobre para formação de complexos com cianeto. Apesar da adição de cobre ser uma estratégia viável para evitar a interferência de sulfeto, optou-se por trabalhar com H₂O₂, haja vista sua eficácia na supressão de interferência sem afetar os sinais analíticos, além de ser ambientalmente amigável.

O efeito de outros ânions que poderiam formar espécies voláteis em meio ácido (sulfito, tiocianato e nitrito) também foi avaliado. O estudo foi realizado comparando as respostas para soluções contendo 50 µg L⁻¹ de CN⁻ na ausência e presença de até 100 mg L⁻¹ de nitrito, tiocianato e sulfito. Os resultados indicaram que não houve interferência na resposta analítica para cianeto. Provavelmente devido ao curto tempo de residência, necessário para formação do gás (HCN) durante a etapa de amostragem. Este mesmo comportamento já foi reportado na literatura [111], sendo enfatizada a ausência de interferência por estas espécies em procedimentos em fluxo. Além disso, estas concentrações são muito superiores às esperadas em amostras de águas naturais.

O procedimento proposto foi aplicado a amostras de águas naturais após adição de 25 ou 50 μg L⁻¹ de cianeto e os resultados são apresentados na Tabela 3.6.

Amostra	Procedimento proposto (µg L ⁻¹)	Método de referência (µg L ⁻¹)
		[114]
1	$\textbf{20,0} \pm \textbf{0,1}$	21,7 ± 0,7
2	$42,5\pm0,2$	$\textbf{41,9} \pm \textbf{1,8}$
3	$19,4\pm0,1$	$\textbf{18,5} \pm \textbf{1,2}$
4	$38,9 \pm 0,6$	$39,7\pm0,4$
5	31,1±0,1	$30,1\pm1,6$
6	54 <i>,</i> 4±0,2	$54,4\pm1,0$
7	$29,8\pm0,7$	$\textbf{28,9}\pm\textbf{0,8}$
8	54,6±0,2	53,7±1,0
9	$\textbf{28,5}\pm\textbf{0,3}$	$\textbf{29,3} \pm \textbf{1,0}$
10	45,8±0,2	$\textbf{46,5} \pm \textbf{1,0}$

Tabela 3.6 - Valores médios e incertezas (n=3) para a determinação de CDA após adição de 25 ou 50 μ g L⁻¹ de cianeto em amostras de águas naturais

Para avaliação de exatidão do procedimento, a Tabela 3.6 apresenta também os resultados obtidos empregando o procedimento fluorimétrico de referência [114]. Pela comparação utilizando teste t pareado, verificou-se que os resultados foram concordantes com 95% de confiança. Nas amostras pode-se observar que algumas concentrações de cianeto determinadas se encontram abaixo das quantidades adicionadas (25 e 50 µg L⁻¹ de CN⁻) devido à formação de complexos inertes com espécies presentes na matriz.

3.5. Conclusões

O procedimento proposto é confiável, rápido, econômico e representa uma alternativa ambientalmente amigável para a determinação de cianeto dissociável em ácidos em águas naturais. O sistema em fluxo com multi-impulsão foi explorado para aumentar a eficiência de difusão e um método inovador baseado na descoloração do complexo [Cu(BQA)₂]³⁻ para determinação indireta de cianeto foi proposto. Espectrofotometria com

longo caminho óptico foi explorada para aumentar a sensibilidade demonstrando pioneiramente que é viável seu emprego na descolorimetria. A etapa de difusão gasosa possibilitou a separação das espécies presentes na matriz. A incorporação da difusão em linha evitou a contaminação da amostra, minimizou riscos ao analista em comparação ao procedimento em batelada [86] e o risco de erros experimentais. Vantagens adicionais em relação aos procedimentos em fluxo que determinam a fração CDA em linha podem ser destacadas (i) o procedimento apresenta um dos menores limites de detecção (coerentes com os limites de cianeto estabelecidos pela legislação ambiental); (ii) não utiliza reagentes tóxicos e (iii) apresenta elevada frequência de amostragem (22 h⁻¹). Estas características tornam o procedimento atrativo para análises de rotina visando o monitoramento ambiental.

4. NOVA ABORDAGEM PARA A EXTRAÇÃO EM PONTO NUVEM EM SISTEMAS DE ANÁLISES EM FLUXO

4.1. Introdução

A extração em ponto nuvem tem sido largamente explorada como uma alternativa limpa à extração líquido-líquido convencional [145]. Entretanto, este procedimento em batelada apresenta algumas limitações, conforme descrito no item 1.2.2.

Na primeira implementação da EPN em sistemas de análises em fluxo foi realizado apenas o transporte da fase rica em surfactante (FRS) para um espectrômetro de absorção atômica com chama, visando a determinação de urânio. Nesta proposta, a EPN foi realizada em batelada empregando Triton X-114 como surfactante após complexação com 1-(2-piridilazo)-2-naftol. Antes da inserção no sistema de análises em fluxo, a FRS foi diluída com HCI [146]. Após esta aplicação, várias propostas para determinação e/ou especiação de metais foram desenvolvidas neste sentido, envolvendo diversas técnicas de detecção. Ag, As, Au, Cd, Cu, Pb e Se foram determinados em águas por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente após formação de complexos hidrofóbicos com 0,0-dietilditiofosfato de amônio [147]; em outra aplicação, Fe, Co e Ni foram determinados em amostras de águas (rio e mar) por espectrometria de absorção atômica com chama, após complexação com pirrolidino ditiocarbamato de amônio [148]; cromo foi determinado em águas de mar e formulações farmacêuticas por espectrofluorimetria após complexação por 8-hidroxiguinolina [149]; especiação de ferro em águas foi realizada por espectrometria de absorção molecular ou atômica [150] e; a EPN foi utilizada para a pré-concentração de mercúrio em águas, após complexação com (5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol e detecção por espectrometria por emissão óptica com plasma acoplado indutivamente [151]. Todas as aplicações mencionadas realizaram diluição da FRS antes da inserção no sistema de detecção utilizando uma solução metanólica [147 - 150] ou ácida [151]. A importância da exploração dos sistemas FIA para transporte da fase rica ao sistema de detecção é no sentido de controlar eficazmente os micro volumes de amostra contendo o analito préconcentrado, garantir a reprodutibilidade das medidas [148], além de reduzir as possibilidades de contaminações.

Somente em 2001, a mecanização da EPN em sistemas de análises em fluxo foi proposta por Fang et al. [152] para a determinação de porfirinas em urina. Soluções de amostra, contendo o surfactante (Triton X-100), foram misturadas por confluência com uma solução salina ((NH₄)₂SO₄) para induzir o ponto nuvem. A FRS foi retida em uma coluna empacotada com material filtrante (*e.g.* algodão, lã de vidro ou filtros de cigarro). Após a eluição com acetonitrila, a FRS foi misturada com reagentes para detecção por quimiluminescência explorando o sistema peroxioxalato.

Segundo os autores, algumas dificuldades frequentemente encontradas para automatizar a EPN em fluxo tiveram de ser superadas: (i) a dificuldade de aquecimento foi contornada explorando o efeito *salting out* para indução do ponto nuvem pela adição de sais; (ii) a separação de fases que geralmente é realizada em batelada por centrifugação foi realizada pela retenção da fase rica em uma coluna contendo material filtrante e eluição com um solvente; (iii) os problemas de espalhamento de radiação nas determinações espectrofotométricas do analito pela presença de agregados de surfactantes foi resolvido empregando detecção por quimiluminescência. Apesar das estratégias inovadoras, este procedimento apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de adição de surfactantes às amostras antes da inserção no sistema FIA e eluição da FRS com um solvente orgânico, diminuindo a potencialidade em ser ambientalmente amigável e causando perda de sensibilidade pela diluição.

A EPN associada aos sistemas de análises em fluxo foi proposta em diversos trabalhos para a determinação de metais, sendo usual a estratégia explorada por Fang et al. [152], *i.e.* a retenção e eluição da FRS com uma coluna empacotada. A primeira aplicação reportada na literatura foi a determinação de cromo em águas de mar e efluentes baseada no seu efeito catalítico sobre a reação entre peróxido de hidrogênio e luminol [153]. Uma mistura de surfactantes (dodecil sulfato de sódio e Triton X-114) foi adicionada a amostra antes da introdução nos sistemas FIA e a adição de sais foi explorada para indução do ponto nuvem em fluxo. Em outras aplicações, mercúrio foi determinado por espectrofotometria com eluição por água quente [154] e a especiação de antimônio foi realizada por espectrometria de emissão óptica com vaporização eletrotérmica (ETV-ICP OES) após eluição por acetonitrila [155]. Para a especiação, após a determinação de Sb(III), a espécie pentavalente foi reduzida com L-cisteína em batelada. A FAAS foi empregada para a determinação de prata com eluição por tetrahidrofurano [156], determinação de manganês, com eluição por 0,05 mol L⁻¹ H₂SO₄ [157] ou 0,5 mol L⁻¹ de HNO₃ [158], íons metálicos com eluição por 0,5 mol L⁻¹ de HNO₃ acrescido de acetona 50% [159]. Visando a detecção por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), um reator de politetrafluoretileno (PTFE) enovelado ou uma coluna preenchida com sílica gel substituíram as usuais colunas preenchidas com algodão para a retenção da FRS na pré-concentração de cobalto [160] e chumbo [161], respectivamente. Alguns trabalhos têm explorado um dispositivo de aquecimento para a formação do ponto nuvem [162] ou para favorecer a EPN em conjunto com o efeito *salting out* [154,163].

A EPN em fluxo também tem sido explorada antes da separação cromatográfica. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) foram extraídos do solo explorando EPN e a fase rica foi retida em uma coluna contendo sílica-gel, seguida de eluição por acetonitrila/água (7:3) e separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [164].

Uma nova abordagem para evitar a eluição da FRS previamente à medida foi proposta e consistiu em posicionar a coluna preenchida com algodão em frente a uma fotomultiplicadora, para determinação de bilirrubina por quimiluminescência em amostras de soro humano [165]. Esta estratégia demonstrou ser atrativa por possibilitar a pré-concentração e detecção simultânea pelo aprisionamento dos agregados micelares na coluna, sem a diluição da amostra na eluição. Contudo, apesar da potencialidade, esta estratégia ainda não foi explorada com outras formas de detecção.

Apesar da extensa aplicação da EPN em fluxo, a associação aos métodos espectrofotométricos é escassa, apenas a determinação de mercúrio [154] e alumínio [166] são encontrados na literatura. No estudo para a determinação de mercúrio, as etapas de extração, pré-concentração e eliminação da interferência de Fe(III) foram realizadas em linha. Apesar da adição de sais para a indução do ponto nuvem pelo efeito *salting out*, o reator foi mergulhado num banho com temperatura controlada. A retenção da FRS foi realizada uma coluna preenchida com algodão e eluição por água quente [154]. No caso da determinação de alumínio, a EPN foi realizada em batelada e a FRS foi inserida por um sistema de análises em fluxo em uma coluna de HPLC [166]. A dificuldade para a detecção espectrofotométrica após a EPN em fluxo se deve às elevadas concentrações de sais e

surfactante na zona de amostra, que podem causar espalhamento da radiação e efeito Schlieren, afetando a precisão e a exatidão [167]. Portanto, novas abordagens para o acoplamento da EPN aos sistemas FIA com detecção espectrofotométrica são necessárias.

Este capítulo da Tese apresenta novas abordagens para a EPN em fluxo em sistemas com multi-impulsão (MPFS-EPN). Microbombas solenoide foram empregadas para modular as vazões, melhorar as condições de mistura e favorecer a formação do ponto nuvem. As medidas espectrofotométricas foram realizadas diretamente na FRS, que foi temporariamente retida na cela de medida, visando aumento da sensibilidade. Além destas inovações, uma reação de neutralização em fluxo foi explorada para induzir o ponto nuvem pela geração de calor e sais, evitando o uso de aquecimento externo.

O procedimento foi aplicado à determinação de ferro em águas, materiais vegetais e alimentos. Ferro é um micronutriente essencial para as plantas e participa de importantes processos metabólicos como respiração, fotossíntese, fixação de nitrogênio, síntese de DNA e hormônios. A sua deficiência causa um distúrbio nutricional e limita a produtividade agrícola, sendo usual o emprego de adubos contendo ferro disponível [168]. Por outro lado, altas concentrações dessa espécie podem ser tóxicas para as plantas, causando estresse oxidativo que afeta a concentração de oxigênio nos compartimentos subcelulares [169]. Em vista destes aspectos, é elevada a demanda por análises de ferro em materiais vegetais para estudos agronômicos.

4.2. Experimental

4.2.1. Equipamentos e acessórios

O sistema de análises em fluxo foi composto por 4 microbombas solenoide (Biochem Valve) com volume nominal de 10 μ L, uma válvula solenoide de três vias (NResearch), tubos de PTFE de 0,8 mm para as linhas de transmissão e conectores de acrílico. A aferição realizada pesando o volume de água dispensado em 100 pulsos indicou que as microbombas solenoide P₁, P₂, P₃ e P₄ dispensavam 11, 10, 13 e 8 μ L por pulso, respectivamente.

82

Os dispositivos ativos foram controlados por um computador Pentium I equipado com uma interface paralela e um circuito integrado (ULN2803) para a compatibilização da corrente. Uma fonte de 12 V foi utilizada para alimentação dos solenoides. Um software desenvolvido em linguagem Visual Basic 6.0 foi empregado para controle dos dispositivos. As medidas foram realizadas com um espectrofotômetro multicanal do tipo CCD (Ocean Optics, modelo USB2000) que consiste numa rede de difração com 600 linhas/mm com arranjo linear de 2048 fotodetectores CCD. A aquisição de dados foi realizada empregando o software (OOIBase32) fornecido pelo fabricante. Cabos de fibra óptica foram utilizados para o transporte da radiação da lâmpada de tungstênio-halogênio (Ocean Optics, modelo LS-1) até a cela de fluxo no formato Z (20 mm de caminho óptico, material PEEK, Ocean Optics) e da cela para o espectrômetro. Um filtro de algodão (*ca.* 1,0 mg) foi cuidadosamente introduzido na saída da cela de fluxo para retenção da FRS diretamente no caminho óptico. O filtro de algodão foi substituído periodicamente para evitar entupimento e garantir a efetiva retenção da FRS. A substituição é rápida (*ca.* 1 min) e reprodutível (variações nas respostas foram menores que 10%).

Uma chapa aquecedora com controle de temperatura foi utilizada nos experimentos em que o ponto nuvem foi induzido por aquecimento externo. Neste caso, o reator foi inserido num banho de areia para distribuição homogênea de calor.

4.2.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade > 18 M Ω cm) e reagentes com grau analítico. Uma solução estoque de 1-(2-tiazolilazo)-2-naftol (TAN, Merck) 5 mmol L⁻¹ foi preparada pela dissolução do reagente em etanol absoluto e o reagente de trabalho foi preparado diariamente pela diluição do estoque. O reagente cromogênico foi preparado contendo TAN 800 mmol L⁻¹ em Triton X-114 1,5% (m/v) e ácido ascórbico 4,0% (m/v) em meio de NH₄CH₃COO 0,5 mol L⁻¹ (pH 5,5). Para a etapa de neutralização em linha, o reagente R₂ (solução neutralizante) foi preparado com NaOH 1,4 mol L⁻¹ e NaCH₃COO 1,6 mol L⁻¹, a partir de soluções estoque de NaCH₃COO 4,0 mol L⁻¹ e de NaOH 10,0 mol L⁻¹ padronizadas por titulação de hidrogenoftalato de potássio, usando fenolfateína como indicador [139]. Soluções de referência de ferro foram preparadas entre 10 e 200 μg L⁻¹ pela diluição de solução estoque 1000 mg L⁻¹ em HNO₃ 0,014 ou 0,67 mol L⁻¹. Água ou NaCH₃COO 0,1 mol L⁻¹ foram usados como transportadores nos sistemas de análises em fluxo com aquecimento externo ou com neutralização em linha, respectivamente.

As amostras de águas foram coletadas de rios da região de Piracicaba-SP, filtradas em membranas de acetato de celulose 0,45 μ m, acidificadas com HNO₃ 0,014 mol L⁻¹ e mantidas sob refrigeração a 4 °C. Previamente às medidas, as amostras foram estabilizadas à temperatura ambiente.

As amostras de materiais de referência certificados foram digeridas com ácidos diluídos e aquecimento assistido por micro-ondas, utilizando 250 mg de amostra, 6 mL de HNO₃ 20 % (v/v) e 2 mL de H₂O₂ 30% (v/v). A temperatura foi gradualmente aumentada até 200 °C (rampa de 20 min) e mantida nesta temperatura por mais 20 min. Após os digeridos serem resfriados à temperatura ambiente, as amostras foram diluídas até 25 mL com água deionisada [170].

4.2.3. Procedimento

O sistema de análises em fluxo (Figura 4.1) foi operado segundo a descrição da Tabela 4.1. A amostra e o reagente foram misturados por amostragem binária com 10 ciclos de amostragem formados por 2 pulsos de amostra (Etapa 1), 1 pulso de reagente cromogênico (Etapa 2) e 1 pulso de solução neutralizante (Etapa 3, requerida apenas para neutralização em linha). A zona de amostra foi transportada (Etapa 4) até a cela espectrofotométrica passando pela bobina de reação B para mistura, formação do complexo hidrofóbico e EPN. A fase rica em surfactante foi temporariamente retida no interior da cela de fluxo, com detecção simultânea a 787 nm (Etapa 5). Após a aquisição do sinal, a frequência de atuação da microbomba solenoide (P₁) foi alterada para 2 Hz para acelerar a limpeza do percurso analítico (Etapa 6). Para a substituição da amostra, as microbombas solenoide P₂ e P₁ foram sequencialmente ativadas, juntamente com a válvula solenoide V, para direcionar o excesso de solução de amostra ao descarte (Etapa 7). As microbombas solenoide P_2 , $P_3 e P_4$ operaram com 5 Hz durante a etapa de amostragem e P_1 a 1 Hz durante a propulsão da zona de amostra através da bobina de reação até a cela de fluxo. Quando empregado, a temperatura do aquecedor foi mantida a (40,0 ± 0,1) °C. A temperatura ambiente foi sempre mantida em (25 ± 1) °C.



Figura 4.1 - Sistema de análises em fluxo com multi-impulsão para extração em ponto nuvem. P₁-P₄: microbombas solenoide; R₁: reagente cromogênico (TAN 800 µmol L⁻¹ + Triton X-114 1,5 % (m/v) + ácido ascórbico 4% (m/v) em tampão acetato 0,5 mol L⁻¹, pH 5,5); B: Bobina de reação de 100 cm; A: amostra; V: válvula solenoide de três vias; DET: cela de fluxo no formato em Z (20 mm, 52 µL de volume interno) acoplada ao espectrofotômetro; a: fibras ópticas; b: entrada da cela de fluxo; c: saída da cela de fluxo; d: porção de algodão; D: descarte; x: ponto de confluência. *Sistema em fluxo com aquecimento externo* – C: transportador (água); linhas pontilhadas indicam reator aquecido a 40,0 ± 0,1 °C. *Sistema em fluxo com neutralização em linha* – R₂: solução neutralizante (NaOH 1,4 mol L⁻¹ e NaCH₃COO 1,6 mol L⁻¹ de) e C: transportador (NaCH₃COO 0,1 mol L⁻¹)

Etapa	Função	Microbomba	Volume (µL)
1 ^a	Inserção de amostra	P ₂	20
2 ^a	Adição de reagente cromogênico	P ₃	13
3 ª	Neutralização/tamponamento	P ₄	8
4 ^b	Transporte pela bobina de reação	P ₁	660
5 ^b	Leitura do sinal analítico	P ₁	330
6 ^c	Limpeza do sistema	P ₁	440
7 ^d	Substituição da amostra	P ₂	600
		P ₁	330

 Tabela 4.1. Rotina de acionamento dos dispositivos para a extração em ponto nuvem em fluxo

^a10 ciclos de amostragem; Microbombas operadas a 5 Hz (a, d), 1 Hz (b) ou 2 Hz (c); ^dVálvula V acionada. A etapa 3 foi usada apenas para indução do ponto nuvem por neutralização em linha.

Antes das medidas espectrofotométricas, o tempo de integração do espectrofotômetro CCD foi ajustado para atingir um valor de absorbância mínimo (entre 0,150-0,200) durante o processamento da solução do branco (água), substituindo a amostra. O sinal analítico foi baseado na diferença dos valores de absorbância na presença e na ausência de analito (branco). Todas as medidas foram baseadas na altura dos sinais e realizadas em triplicata.

4.2.4. Procedimento de referência

O procedimento de referência para análise das amostras de água foi baseado na medida espectrofotométrica do complexo ferro-fenantrolina descrito pelo Standard Methods [86], porém com redução de 10 vezes dos volumes de todas as soluções. Neste procedimento, Fe(III) foi reduzido com hidroxilamina e a reação com fenantrolina foi realizada em meio de tampão acetato, pH 4,7. No protocolo para a construção da curva de calibração, balões volumétricos de 10 mL foram utilizados para a adição de diferentes alíquotas de solução de Fe(III), 0,1 mL de hidroxilamina 10% (m/v), 0,1 mL de tampão acetato (3 mol L⁻¹), com a adição de água até o volume de 7,5 mL; em seguida, foi adicionado 1,0 mL de solução de fenantrolina 10% (m/v) e o volume foi ajustado até 10 mL com água. Após 10 min, as medidas espectrofotométricas foram realizadas. A solução para a medida do branco foi obtida pelo mesmo protocolo, porém sem a adição de ferro. Para aumentar a

sensibilidade e permitir a quantificação de ferro nas amostras, uma cela de fluxo de 100 cm, baseada em um guia de ondas de sílica fundida recoberta com Teflon AF 2400[®] foi utilizada [170].

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Aspectos gerais

O procedimento baseou-se na reação entre íons Fe(II) e o reagente cromogênico 1-(2-tiazolilazo)-2-naftol (TAN), na proporção estequiométrica ferro(II)-TAN 1:2, na presença de um agente redutor. O complexo é formado imediatamente após mistura dos reagentes e permanece estável por até 2 horas [171]. O complexo Fe(II)-TAN absorve radiação em dois comprimentos de onda na região visível (560 e 787 nm). Neste trabalho, o segundo comprimento de onda foi selecionado visando maior seletividade, uma vez que outros complexos metal-TAN absorvem radiação em torno de 560 nm, podendo causar interferências espectrais. O complexante apresenta máximo de absorção de radiação em 487 nm (pH 4,75) e não contribui significativamente como espécie absorvente no comprimento de onda de 787 nm. A Figura 4.2 apresenta os espectros de absorção do complexo ferro(II)-TAN e da solução do branco.



Figura 4.2 - Espectros de absorção do complexo Fe(II)-TAN (a) e da solução de branco (b). Condições: TAN 0,4 mmol L⁻¹; ácido ascórbico 4% (m/v); NH₄CH₃COO 0,5 mol L⁻¹ (pH 5,5)

Novas estratégias foram adotadas para superar os inconvenientes usualmente encontrados na EPN em fluxo tais como a necessidade de eluição da FRS previamente à medida, que causa diluição e, na maioria das vezes, requer solventes orgânicos [152,155,156,159,164]. A FRS foi temporariamente retida no interior da cela de fluxo, possibilitando o monitoramento simultâneo da absorbância, antes da remoção pelo próprio transportador, após aumento da frequência de pulsação da microbomba correspondente (Figura 4.1-P₁). Esta estratégia foi eficiente devido ao fluxo pulsado, inerente às microbombas solenoide, que possibilitou a rápida remoção da FRS sem causar deriva da linha de base.

Duas estratégias foram exploradas para a indução do ponto nuvem em fluxo. Na primeira, foi realizado aquecimento a temperatura controlada por um dispositivo externo. Na Figura 4.3 é apresentado o efeito da temperatura sobre os sinais do branco e da solução de Fe(III) 1 mg L⁻¹, sendo possível observar que o sinal analítico, referente à diferença entre referência e branco, atingiu o máximo a 40 °C (0,420), sendo a temperatura medida diretamente no banho de areia. As menores respostas abaixo de 40 °C indicam que não houve calor suficiente para a efetiva separação de fases. Acima de 40 °C, a temperatura pode ter sido demasiadamente elevada a ponto de prejudicar a retenção da FRS na cela de medida devido à diminuição de viscosidade.



Figura 4.3 - Efeito da temperatura sobre os sinais da solução de Fe(III) 1 mg L⁻¹ (a) e do branco (b). Condições: TAN 400 μ mol L⁻¹; Triton X-114 1,5 % (m/v); ácido ascórbico 4% (m/v); NH₄CH₃COO 0,5 mol L⁻¹ (pH 5,5)

Na segunda estratégia, uma reação de neutralização em linha foi explorada para fornecer calor para indução do ponto nuvem. Esta estratégia foi aplicada às amostras digeridas com ácidos diluídos (*e.g.* digeridos de materiais biológicos e alimentos), que requerem ajuste de acidez para a formação do complexo. Para que a proposta seja viável, o calor proporcionado pela reação de neutralização em linha, juntamente com a geração de sais, devem ser suficientes para induzir o ponto nuvem. Por esta razão, Triton X-114 foi o surfactante selecionado por apresentar ponto nuvem entre 22 e 25 °C. Reação de neutralização em linha foi previamente explorada para aumentar a velocidade de reação de Berthelot para a determinação de amônio em amostras digeridas com ácido sulfúrico [172]. Nas condições descritas na Tabela 4.1, verificou-se que a temperatura no sistema em fluxo ficou próxima a 32 °C e que a reação de neutralização forneceu calor suficiente para promover a separação de fases.

Dois materiais filtrantes (algodão e membrana de poliéster 270 mesh), posicionados na cela de medida conforme indicado na Figura 4.1, foram avaliados para a retenção momentânea da FRS, sem impedir a passagem do fluido. Foi também considerada a resposta obtida na ausência do material filtrante, sendo observado que a retenção da FRS no caminho óptico com membrana de poliéster aumentou o sinal em 40%. Na comparação entre algodão e membrana de poliéster (Figura 4.4) verifica-se que o algodão foi mais efetivo para a retenção da FRS, com um aumento de 25% na resposta. A diferença entre os resultados obtidos com algodão e a membrana deve-se essencialmente à redução dos sinais do branco. Outra vantagem, observada no decorrer dos experimentos empregando algodão é mais acessível e pode ser facilmente removido da cela de fluxo, facilitando a rápida substituição, sendo selecionado para os experimentos futuros.



Figura 4.4 - Comparação entre algodão (I) e membrana de poliéster (II) como materiais filtrantes para a retenção da FRS na cela de medida: (a) sinais do branco e (b) solução de Fe(III) 1 mg L⁻¹. Condições: TAN 400 µmol L⁻¹; Triton X-114 1,5 % (m/v); ácido ascórbico 4% (m/v); NH₄CH₃COO 0,5 molL⁻¹ (pH 5,5)

Os volumes dispensados pelas microbombas solenoide, que apresentam baixo torque, são criticamente dependentes da contra-pressão no percurso analítico. Um decréscimo de 30% do volume dispensado foi observado devido ao posicionamento do algodão na saída da cela de fluxo. Entretanto, a reprodutibilidade não foi afetada e o efeito foi compensado pela aferição periódica de cada microbomba nas condições experimentais definidas na EPN em fluxo.

Durante os experimentos com aquecimento da zona de amostra para a indução do ponto nuvem, verificou-se uma frequente formação de bolhas. Uma estratégia simples foi adotada para superar este problema - um reator de menor diâmetro (0,5 mm, 300 cm) foi posicionado na saída da cela de fluxo. A presença do reator promoveu um leve aumento da pressão, evitando a geração de bolhas pelo desprendimento de gases dissolvidos, melhorando significativamente a repetibilidade, conforme se observa na Figura 4.5. Cabe destacar que nova aferição dos volumes dispensados pelas microbombas foi realizada na presença deste reator, não sendo observada qualquer variação nas vazões obtidas anteriormente.



Figura 4.5 - Comparação das respostas sem (I) e com (II) a adaptação de um tubo de 0,5 mm de diâmetro (300 cm de comprimento) na saída da cela de fluxo: (a) sinais do branco e (b) solução de Fe(III) 1 mg L⁻¹. Condições: TAN 400 μ mol L⁻¹; Triton X-114 1,5 % (m/v); ácido ascórbico 4% (m/v); NH₄CH₃COO 0,5 mol L⁻¹ (pH 5,5)

O espalhamento de radiação causado pelo surfactante no meio reacional influencia medidas espectrofotométricas, comprometendo a precisão e a exatidão do as procedimento. Além disso, o aumento significativo do sinal do branco compromete a faixa de resposta e pode afetar o limite de detecção. O mesmo problema é usualmente observado em espectrofotometria em fase sólida [84]. Para contornar este inconveniente, duas estratégias foram avaliadas. Na primeira, avaliou-se a possibilidade de correção por medidas de absorbância em dois comprimentos de onda (787 e 850 nm), tomando a diferença entre as respostas como parâmetro analítico. Os sinais corrigidos (Figura 4.6) indicam que a estratégia foi eficiente para compensar o efeito do espalhamento de radiação. O comprimento de onda de referência (850 nm) foi selecionado em função da menor absorção de radiação pelo complexo, como pode observado na Figura 4.2. Esta correção pode ser facilmente realizada pelo próprio software do espectrofotômetro multicanal, sem alteração no tempo de medida ou na configuração do sistema de análises em fluxo. Cabe destacar que a intensidade da perturbação por espalhamento de radiação deve ser a mesma em ambos os comprimentos de onda para assegurar a eficácia desta estratégia [167].



Figura 4.6 - Estratégia para a compensação de espalhamento de radiação com base em medidas espectrofotométricas em dois comprimentos de onda: (a) respostas do branco e (b) solução de Fe(III) 1 mg L⁻¹. Sinais transientes referem-se a 787 nm (—); 850 nm (—) e diferença entre os valores de absorbância (—). Condições: TAN 400 µmol L⁻¹; Triton X-114 1,5 % (m/v); ácido ascórbico 4% (m/v); NH₄CH₃COO 0,5 mol L⁻¹ (pH 5,5)

Na segunda estratégia, ajustou-se o tempo de integração (diretamente no software do espectrofotômetro) com a solução branco na cela de medida, visando compensar a perturbação por espalhamento de radiação. Esta estratégia corresponde ao ajuste de zero com a FRS sem o analito, semelhante ao empregado em espectrofotometria em fase sólida. O ajuste foi feito de forma a gerar valores mensuráveis, porém mínimos, na presença da FRS, pois tempos de integração excessivos afetariam a resposta analítica, inviabilizando a detecção de menores concentrações do analito. Com esta estratégia, a magnitude do branco foi minimizada (0,180 \pm 0,003, n = 15) e, conforme se observa na Figura 4.7, o sinal analítico não foi significativamente afetado. Uma vez que esta estratégia é mais geral e pode ser aplicada em outros procedimentos, foi selecionada para os experimentos posteriores. Entretanto, deve-se ressaltar que a aparente estabilidade da linha base observada com esta estratégia deve-se à medida em condições de saturação do sistema de detecção na ausência de surfactante. Esta condição não afeta a medida analítica, que considera a diferença entre os sinais da solução de referência e do branco.



Figura 4.7 - Efeito do tempo de integração do espectrofotômetro multicanal nos sinais da solução de Fe(III) 1 mg L⁻¹ (a) e do branco (b). Condições: TAN 400 μ mol L⁻¹; Triton X-114 1,5 % (m/v); ácido ascórbico 4% (m/v); NH₄CH₃COO 0,5 mol L⁻¹ (pH 5,5)

As microbombas solenoide foram selecionadas como dispositivos propulsores por proporcionarem melhores condições de mistura (maior difusão radial) e maior eficiência de transferência de calor devido ao fluxo pulsado, favorecendo o desenvolvimento das reações [22,173] e a separação de fases. Além disso, estes dispositivos permitem modular a vazão dos fluidos, que é proporcional à frequência de pulsação e pode ser facilmente alterada no programa de controle. Após a amostragem (com as microbombas operando em 5 Hz), a frequência do transportador foi alterada para 1 Hz, que corresponde a 0,7 mL min⁻¹, visando aumentar o tempo de residência e a eficiência de aquecimento para a separação de fases, além de favorecer a retenção da FRS na cela de medida. Esta alteração resultou em um aumento de 50% no sinal analítico (Figura 4.8) e foi adotada para os experimentos futuros.



Figura 4.8 - Efeito da frequência de pulsação (microbomba P₁, Figura 4.1) sobre os sinais da solução de Fe(III) 1 mg L⁻¹ (a) e do branco (b). Condições: TAN 400 μ mol L⁻¹; Triton X-114 1,5 % (m/v); ácido ascórbico 4% (m/v); NH₄CH₃COO 0,5 mol L⁻¹ (pH 5,5)

Diferentes sais (NaCl, Na₂SO₄ e (NH₄)₂SO₄) na concentração 0,5 mol L⁻¹, adicionados no reagente R₁, foram avaliados para diminuir o ponto nuvem e favorecer a separação das fases. Neste experimento, o sal foi adicionado no reagente Como não foram observadas alterações significativas, optou-se por trabalhar sem a adição de sais para aumento da força iônica. Após atingir o máximo do sinal transiente, a frequência de pulsação foi aumentada para 2 Hz visando acelerar a remoção da FRS retida no caminho óptico e evitar efeito de memória.

4.3.2. Otimização do procedimento

Os efeitos dos principais parâmetros que afetam a formação do complexo e a EPN (vazão, temperatura, pH e concentração de reagentes) foram avaliados usando uma solução de referência de Fe(III). Os sinais analíticos foram obtidos pela diferença entre as absorbâncias da solução de referência e do branco. O tempo de integração foi ajustado (entre 3 e 6 ms) em cada estudo para obter um sinal mínimo de branco (entre 0,150 a 0,200).

Para a avaliação do efeito da concentração de surfactante, o Triton X-114 foi adicionado diretamente no reagente cromogênico contendo 400 mmol L⁻¹ de TAN e 4% (m/v) de ácido ascórbico em meio de NH₄CH₃COO 0,5 mol L⁻¹ (pH 5,5). Desta forma, evitou-se uma etapa adicional de preparo da amostra (adição de surfactante a cada solução), usualmente encontrada em outros procedimentos de EPN em fluxo [152,155,174]. Observase que tanto os sinais do branco, quanto os da solução de referência, aumentam com a concentração de surfactante (Figura 4.9), devido ao efeito do espalhamento de radiação. Pode-se observar também que concentrações abaixo de 1,5 % não foram eficientes para a extração e que elevadas concentrações (> 3,0%) causaram redução do sinal devido à diluição do complexo na fase rica. Como os sinais analíticos não foram significativamente diferentes para concentrações de Triton X-114 entre 1,5 e 3,0% (0,214 e 0,264, respectivamente), para minimizar os valores de branco e a geração de resíduos, experimentos subsequentes foram realizados com 1,5% (m/v) de surfactante. Esta concentração é 26 vezes superior à concentração micelar crítica (0,35 mmol L⁻¹) na zona de amostra [149], assegurando o excesso necessário para a EPN.



Figura 4.9 - Efeito da concentração de Triton X-114 sobre os sinais da solução de Fe(III) 500 μ g L⁻¹ (a) e do branco (b). Condições: TAN 400 μ mol L⁻¹; ácido ascórbico 4% (m/v); NH₄CH₃COO 0,5 mol L⁻¹ (pH 5,5)

A extração de metais empregando EPN depende diretamente da formação de complexo hidrofóbico. Desta forma, o efeito da concentração de TAN na zona de amostra foi avaliado (Figura 4.10), não sendo observada variação significativa a partir de 400 μmol L⁻¹. Esta concentração corresponde a um excesso de 15 vezes de ligante em relação ao analito. Contudo, selecionou-se TAN 800 μmol L⁻¹ para os estudos posteriores, visando evitar interferências por reações competitivas na presença de outras espécies metálicas que formam complexos com TAN. Esta concentração é aproximadamente 60% maior que a empregada no procedimento em batelada [171].



Figura 4.10 - Efeito da concentração de TAN sobre os sinais da solução de Fe(III) 500 μ g L⁻¹ (a) e do branco (b). Condições: Triton X-114 1,5 % (m/v); ácido ascórbico 4% (m/v); NH₄CH₃COO 0,5 mol L⁻¹ (pH 5,5)

Visando a determinação de ferro total, o reagente cromogênico foi preparado em meio de um agente redutor. Ácido ascórbico e hidroxilamina geraram resultados semelhantes como redutores de Fe(III) e ácido ascórbico foi selecionado devido à baixa toxicidade. Largo excesso de reagente (4% m/v) foi utilizado para aumentar a estabilidade da solução e prolongar o tempo de vida do reagente. Com este reagente, a redução dos íons Fe(III) foi muito rápida e o tempo de residência da amostra foi suficiente para garantir a conversão quantitativa do analito.

O efeito da fração volumétrica amostra:reagente foi avaliado explorando a amostragem binária [18], mantendo constante a somatória do número de pulsos (7) e utilizando 5 ciclos de amostragem (Figura 4.11). Observou-se que os valores de branco diminuíram à medida que diminuiu a fração volumétrica do reagente porque o espalhamento da radiação é menos pronunciado com menores quantidades de Triton X-114. Porém, a extração do complexo não foi efetiva em condições limites, ou seja, elevada razão amostra:reagente e vice-versa (1:6 e 6:1). A proporção entre amostra e reagente 5:2 foi então selecionada como um compromisso entre os sinais analítico e do branco.



Figura 4.11 - Efeito da razão volumétrica amostra:reagente sobre os sinais da solução de Fe(III) 500 μ g L⁻¹ (a) e do branco (b). Condições: TAN 400 μ mol L⁻¹; Triton X-114 1,5 % (m/v); ácido ascórbico 4% (m/v); NH₄CH₃COO 0,5 mol L⁻¹ (pH 5,5)

Maiores sinais do branco e da solução de referência foram obtidos com o aumento do número de ciclos de amostragem (Figura 4.12). Este aumento deve-se à menor dispersão da zona de amostra no transportador devido ao maior volume. Abaixo de 3 ciclos de amostragem, a quantidade de FRS para retenção no caminho óptico é pequena, afetando a resposta analítica. Acima de 5 ciclos, o elevado volume de fase rica causa diluição do analito. Com isto, selecionou-se 5 ciclos de amostragem visando maior sinal analítico.



Figura 4.12 - Efeito do número de ciclos de amostragem sobre os sinais da solução de Fe(III) 500 μ g L⁻¹ (a) e do branco (b). Condições: TAN 400 μ mol L⁻¹; Triton X-114 1,5 % (m/v); ácido ascórbico 4% (m/v); NH₄CH₃COO 0,5 mol L⁻¹ (pH 5,5)

Visando melhores condições de mistura, empregou-se a proporção amostra:reagente = 2:1 e 10 ciclos de amostragem (em substituição a 5:2 e 5 ciclos de amostragem). Esta alteração foi estabelecida a fim de aumentar a distribuição do calor na zona de amostra, durante a etapa de neutralização, sem prejuízo da sensibilidade.

O comprimento do reator afeta o tempo de residência para a ocorrência dos diversos processos requeridos na EPN, *i.e.* redução de ferro(III), formação do complexo Fe(II)-TAN e extração em ponto nuvem. Reatores de 50, 100 e 150 cm que correspondem a volumes de 250, 500 e 750 µL, respectivamente, foram avaliados. O reator de 50 cm não foi efetivo para a extração do analito e o de 150 cm, diminuiu o sinal analítico em *ca*. 23% devido à dispersão da zona de amostra. O reator de 100 cm foi então selecionado como um compromisso entre o tempo de residência da zona de amostra e a frequência de amostragem.

A neutralização em linha foi avaliada como uma alternativa ao sistema de aquecimento externo para a indução do ponto nuvem. Esta estratégia explorou a

necessidade de ajuste de acidez dos digeridos ácidos para a formação com complexo Fe(II)-TAN. Uma microbomba solenoide, que dispensava um volume de 8 μ L por pulso, foi inserida no módulo de análises (Figura 4.1-P₄) para a inserção da solução neutralizante, contendo 1,4 mol L⁻¹ de NaOH e 1,6 mol L⁻¹ de NaCH₃COO. O objetivo foi a neutralização parcial do ácido com NaOH, de forma que tanto o calor produzido quanto os sais gerados contribuiriam para gerar o ponto nuvem em fluxo, além do tamponamento em linha pela mistura do ácido remanescente com o acetato. Neste sentido, a concentração de NaOH (0,27 mol L⁻¹ na zona de amostra) foi definida de forma a garantir uma quantidade de OH⁻¹ levemente abaixo da concentração ácida da amostra (0,32 mol L⁻¹). Acetato de sódio (0,31 mol L⁻¹) foi empregado no reagente R₂ para formação da solução tampão com pH adequado à formação do complexo. Nas condições empregadas, o pH final foi de 5,5 e a temperatura na zona de amostra foi de 32 °C. Este pH é favorável à formação do complexo, como um compromisso entre a protonação do ligante e a hidrólise do metal, estando de acordo com o reportado em trabalhos anteriores [170].

Um resumo das variáveis otimizadas, os intervalos de estudo e os valores selecionados para cada parâmetro de interesse na EPN em fluxo para a determinação de ferro podem ser visualizados na Tabela 4.2.

Parâmetro	Intervalo	Valor selecionado
Concentração de Triton X-114 (%, m/v)	0,1 - 5,0	1,5
Concentração de TAN (µmol L⁻¹)	100 - 1200	800
Concentração de NaOH (mol L ⁻¹) ^a	0,5 – 2,5	1,4
Concentração de NaCH₃COOH (mol L ⁻¹) ^a	0,5 – 3,0	1,6
рН	3,5 – 6,5	5,5
Volume do reator (μL)	250 – 750	500
Temperatura da bobina de reação (ºC) ^b	25 – 60	40

Tabela 4.2. Parâmetros otimizados para extração em ponto nuvem em fluxo.

^aempregado somente para o procedimento com neutralização em linha; ^bsomente quando aquecimento externo foi empregado

4.4. Características analíticas e aplicações

O procedimento com aquecimento externo apresentou resposta linear entre 10 e 200 μ g L⁻¹, descrito pela equação S = 0,0113 + 0,00566 C_{Fe} (r = 0,999), em que S corresponde ao sinal analítico e C à concentração de ferro em μ g L⁻¹. Alguns sinais transientes são apresentados na Figura 4.13. A aparente estabilidade da linha de base indica que o sistema de detecção estava saturado, devido ao ajuste do branco na presença de surfactante. A boa repetibilidade nas respostas indica que não houve efeito de memória, bem como a efetiva remoção da FRS entre as medidas sem necessitar da adição de um eluente.



Figura 4.13 - Sinais transientes obtidos para soluções de referência de ferro na EPN em fluxo. Números sobre os registros indicam as concentrações em μ g L⁻¹ e o gráfico interno refere-se à curva de calibração. As condições empregadas são descritas na Tabela 4.2

O mesmo comportamento foi observado no sistema com neutralização em linha, que apresentou faixa de resposta linear entre 10 e 100 μ g L⁻¹, descrita pela equação S = -0,00105 + 0,00434 C_{Fe} (r = 0,999). A redução na sensibilidade é devida à diluição pela solução neutralizante que foi adicionada à zona de amostra. O coeficiente de variação (50 μ g L⁻¹, n = 7), o limite de detecção (99,7 % de confiança) e a frequência de amostragem foram

estimados em 2,3 %, 5 μ g L⁻¹ e 26 determinações h⁻¹, respectivamente. O procedimento consumiu 200 μ L de amostra, 6 μ g de TAN e 390 μ g de Triton X-114 por determinação. Este consumo de TAN e Triton X-114 foi 25 e 130 vezes menor que no procedimento em batelada [171], o que enfatiza a característica do procedimento proposto ser ambientalmente amigável.

A absortividade molar aparente, estimada em 1,7 x 10⁵ L mol⁻¹ cm⁻¹, é 10 vezes maior que a encontrada no procedimento espectrofotométrico em batelada [171] e semelhante à obtida no procedimento em batelada que emprega EPN [170], com a vantagem de empregar um volume de amostra 62 vezes menor. O volume reduzido é um aspecto importante quando se consideram os volumes limitados de algumas amostras ou a necessidade de transportá-las por longas distâncias.

Uma comparação das figuras de mérito com as obtidas em outros procedimentos descritos na literatura é apresentada na Tabela 4.3. Estes procedimentos envolvem a determinação de ferro empregando pré-concentração em fluxo ou em batelada. Os procedimentos em batelada, além de serem demorados e exaustivos, usualmente empregam grandes volumes de amostra (10 a 500 mL) como estratégia para obtenção de menores limites de detecção.

Comparando com os trabalhos que empregam espectrofotometria UV-vis, o procedimento proposto apresentou um dos menores limites de detecção associado à maior frequência de amostragem. Outra vantagem que merece destaque no procedimento proposto é que todas as etapas são realizadas em linha, incluindo a neutralização, ajuste do pH e adição de surfactante, evitando etapas de preparo de amostra usuais em outros procedimentos [152,153,155,157,162 - 164,175].

O fator de enriquecimento foi estimado em 8,9 pela razão dos coeficientes angulares das curvas analíticas com e sem a etapa de pré-concentração. Quando o algodão foi removido da cela espectrofotométrica o fator de enriquecimento foi 5,3, o que indica a importância do filtro para agregar a fase rica e promover aumento do sinal analítico. Apesar de maiores fatores de enriquecimento terem sido obtidos em outros procedimentos (Tabela 4.3), isto não necessariamente demonstra maior eficiência, uma vez que podem ter sido alcançados às custas de elevados volumes de amostra e longos períodos de pré-

concentração [70]. Neste sentido, a eficiência de concentração (EC) é um parâmetro mais apropriado para avaliar a eficiência de enriquecimento do analito em função do tempo. Utilizando-se 200 µL de amostra, a eficiência de concentração foi estimada em 3,9 min⁻¹ ficando entre as mais elevadas entre os procedimentos listados na Tabela 4.3. O índice de consumo (IC), definido como o volume de amostra requerido para obter fator de enriquecimento igual a 1 também é importante para avaliar os procedimentos que empregam pré-concentração. Neste procedimento, o IC foi estimado em 0,022 mL, sendo o menor entre os apresentados na Tabela 4.3. Estes fatores podem ser empregados também utilizam comparação procedimentos que para com outros pré-concentração, independentemente do princípio de separação. Pode-se observar que o menor IC e uma das maiores EC foram obtidas dentre os procedimentos que exploram EPN em fluxo (Tabela 4.4).

batelada	
em	
analito	
в	
pré-concentração	
explorando	
ferro	
de de	
determinação	
e e	
par	
procedimentos	
dos	
mérito	
d e-	
Figuras	
4.3.	nha
Tabela	ou em li

Procedimento	LD (µg L ⁻¹)	FA (h ⁻¹)	比	Va (mL)	EC (min ⁻¹)	IC (mL)	CV (%)	Referência
Multi-impulsão-EPN(TAN)ª	5,0	26	8,9	0,200	3,9	0,022	2,3	Este trabalho
EPN-batelada(TAN) ^b	10	2	30	15	1,0	0,5	I	[170]
EPN-batelada(5-Br-PADAP)ª	1,0	ŝ	20	10	1,0	0,50	2,6	[176]
ELL (<i>p</i> -diclorobenzeno) ^a	1,98	4	42,5	100	2,8	2,3	1,3	[177]
Extração fase sólida(Whatman P-81)ª	0,2	2	195	100	6,5	0,51	2,0	[178]
FI-extração fase sólida (C18)ª	15	25	10	0,625	4,2	0,062	4,0	[179]
EFS(silica-PEG) ^a	0,57	2	125	250	4,2	2,0	1,7–2,4	[180]
EFS(C18) ^a	0,98	2	50	500	1,7	10	I	[181]
EFS(MWCNT) ^c	$0,17 \times 10^{-3}$	0,5	210	320	1,7	1,5	5,3	[182]
MSFIA-EFS(XAD-4)ª	5,6	9	2,5	5	0,25	2,0	1,5	[183]
FI-EFS(PUF) ^a	18	20	36	3,37	12	60'0	5,7	[184]
EFS(MWCNT) ^b	4,9	I	20	100	I	2	2,5	[185]
FI-EFS(C ₁₈ /ferrozina) ^a	17×10^{-3}	ŝ	I	40	I	I	3-15	[186]
Detecção: ªespectrofotometria; ^b espectro 5-Br-PADAP: 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-d	ometria de abso lietilaminofenol	rção atômica ; C ₁₈ : sílica	a com chi funciona	ama; ^c espectr lizada C ₁₈ ; C/	ometria de absor /: coeficiente de	rção atômica co variação; EC:	om atomizaçã : eficiência d	lo eletrotérmica. e concentração;
	2					•		

enriquecimento; FI: sistemas de análises por injeção em fluxo; IC: índice de consumo; LD: limite de detecção; MWCNT: nanotubos de carbono de paredes ELL: extração líquido-líquido; EFS: extração em fase sólida; EPS: espectrofotometria em fase sólida; FA: frequência de amostragem; FE: fator de múltiplas; PEG: polietilenoglicol; PUF: espuma de poliuretano; TAN: 1-(2-tiazolilazo)-2-naftol; Va: volume de amostra

Analito(Detecção)	FA (h ⁻¹)	빞	Va (mL)	EC (min ⁻¹)	IC (mL ⁻¹)	CV (%)	Referência
Fe(espectrofotometria)	26	8,9	0,200	3,9	0,022	2,3	Este trabalho
Cuproporfirina(quimiluminescência)	30	9'6	4,0	4,8	0,42	2,2	[152]
Cr(quimiluminescência)	12	6,0	12,5	1,2	2,1	1,6	[153]
Hg(espectrofotometria)	30/4ª	6,0	2,2	3,0/0,4ª	0,37	4,8	[154]
Sb(ETV-ICP-OES)	1,5	872	100	21,8	0,11	4,3	[155]
Ag(FAAS)	10	38	4,0	6,3	0,11	2,0	[156]
Mn(FAAS)	48	14	2,8	11,2	0,20	6,3	[157]
Mn(FAAS)	30	17	3,0	8,0	0,19	2,0 ^b	[158]
Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn(FAAS)	30	8,4	16,8	4,2	2,0	4,8 ^b	[159]
Co(ETAAS)	24	15	5,0	6,0	0,33	4,5	[160]
Pb(ETAAS)	30	22,5	2,2	11,2	0,098	2,9	[161]
Gd(ICP-OES)	22	20	10	7,3	0,50	1,9	[163]
HPAs(HPLC)	16^{c}	6,0 ^c	1,0	1,6	0,17	<7,4 ^d	[164]
Benzo-a-pireno(quimiluminescência)	20	5,2	3,45	1,73	0,66	I	[175]
CV: coeficiente de variação; EC: eficiência d amostragem: FAAS: ecnectrometria de abs	le concentração orcão atômica	; ETAAS: espe	ectrometria de · EF· fator de	absorção atômic	a com atomiza HPA· hidrocar	ção eletrotérm honeto policíci	ica; FA: frequência de lico aromático: HPI C·

Tabela 4.4. Comparação de procedimentos analíticos em fluxo explorando extração em ponto nuvem

cromatografia líquida de alta eficiência; IC: índice de consumo; ICP OES: espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente; Va: volume de amostra.

^avalores considerando a EPN em fluxo para remoção de interferência; ^bvalor mais elevado de CV obtido na análise das amostras; ^cvolumes estimados a partir dos tempos de transporte e eluição; ^dvalores médios para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Em comparação a outros procedimentos que exploram EPN em fluxo [153, 156, 160, 164, 175], maior frequência de amostragem foi obtida. Isto ocorre em consequência do tempo despendido na eluição e regeneração da coluna preenchida com material filtrante para retenção da fase rica, etapas não requeridas no procedimento proposto. Alguns procedimentos requerem até 5 min para processamento da amostra [153, 156, 164] e outros não consideram o tempo gasto nas etapas de extração antes da injeção da amostra no sistema em fluxo na estimativa de frequência de amostragem [147-151].

4.4.1. Efeito de espécies concomitantes

O efeito de espécies concomitantes presentes nas amostras de águas naturais, materiais biológicos e alimentos foi avaliado empregando uma solução 50 μ g L⁻¹ Fe(III) com excesso de 1000 vezes de Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Sr²⁺, Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, CO₃²⁻; 100 vezes de Mn²⁺, Al³⁺, PO₄³⁻; 10 vezes de Zn²⁺ e 5 vezes de Cu²⁺, Ni²⁺. As respostas indicam que estas concentrações não interferiram na determinação de ferro (variação dos sinais foi menor que 5%). O procedimento proposto é, portanto, seletivo, tolerando íons metálicos e ânions inorgânicos em concentrações relativamente maiores que as usualmente encontradas em amostras de águas naturais ou digeridos de materiais biológicos e alimentos. Outros íons metálicos que reagem com TAN (Cu²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ e VO²⁺) são usualmente encontrados em concentrações abaixo da concentração de ferro em amostras de águas, materiais biológicos e alimentos. Estas espécies não interferiram quando avaliadas na mesma concentração que ferro, devido à seletividade promovida pelo comprimento de onda de medida e ao excesso de ligante presente na zona de amostra. Estes resultados concordam com os reportados em outros procedimentos envolvendo a reação com TAN [170,171].

4.4.2. Análises de amostras de águas naturais e materiais de referência certificados

Para avaliar a exatidão do procedimento, foram analisadas 9 amostras de águas naturais (Tabela 4.5) e 5 materiais de referência certificados (Tabela 4.6). Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente pelo teste t pareado e foram concordantes tanto com os obtidos pelo procedimento de referência [86] quanto com os valores certificados, com 95 % de confiança.

	Ferro (µ	g L ⁻¹)
Amostra	Procedimento com multi-	Procedimento de
	impulsão*	referência [86]
1	1478 ± 60	1524 ± 65
2	1560 ± 54	1556 ± 52
3	1789 ± 64	1792 ± 66
4	1350 ± 51	1346 ± 20
5	1362 ± 28	1388 ± 36
6	799 ± 44	814 ± 54
7	844 ± 5	847 ± 9
8	756 ± 37	743 ± 35
9	667 ± 32	654 ± 14

Tabela 4.5 - Valores médios e incertezas (n=3) para a determinação de ferro total em águasnaturais empregando o procedimento com aquecimento externo

* analisadas após diluição de 4 a 10 vezes

Avaliou-se também a exatidão do sistema empregando EPN em fluxo com aquecimento convencional e neutralização em batelada, comparada com a neutralização em linha, utilizando-se os materiais de referência certificados (Tabela 4.6). Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente pelo teste t pareado e também foram concordantes com 95% de confiança.
		Ferro (mg kg⁻¹)	
Amostra	Neutralização	Neutralização em	Valor
	prévia	linha	certificado
Farinha de arroz (NIES 10-a) ^a	13,0 ± 0,2	14,0 ± 0,7	$\textbf{12,7}\pm\textbf{0,7}$
Músculo bovino (RM8414) ^b	70,9 ± 0,6	$71,7\pm0,6$	71,2 ± 9,2
Pão integral (BCR-191) ^c	41,6 ± 0,2		40,7 ± 0,7
hepatopâncreas de lagosta(Tort-2) ^b	104,2 \pm 1,1		105,0 \pm 12
Leite em pó (A-11) ^d	—	3,5 ± 0,2	3,65 ± 0,76

Tabela 4.6 - Valores médios e incertezas (n=3) para a determinação de ferro em materiais de referência certificados

a National Institute for Environmental Studies

b National Research Council Canada

c Institute for Reference Materials and Measurements

d International Atomic Energy Agency

4.5. Conclusões

Neste capítulo, foram discutidas novas estratégias para extração em ponto nuvem nos sistemas de análises em fluxo, a fim de superar as dificuldades normalmente encontradas nos procedimentos em batelada (*e.g.* consumo de tempo nas etapas de aquecimento e centrifugação) e em fluxo (*e.g.* uso de solventes orgânicos e diluição da fase rica na etapa de eluição). Microbombas solenoide foram eficientemente utilizadas para modular a vazão, melhorar as condições de mistura e aumentar a eficiência de transferência de calor, a fim de facilitar a formação do ponto nuvem. Sensibilidade foi aumentada pelas medidas de absorbância realizadas diretamente na fase rica que ficou temporariamente retida no caminho óptico. A FRS foi rapidamente removida da cela de fluxo, sem causar efeito de memória nos sinais analíticos, em virtude do movimento caótico promovido pelas microbombas solenoide. O ajuste do tempo de integração do espectrofotômetro foi eficiente para compensar o efeito do espalhamento de radiação e minimizar os valores do branco. A reação de neutralização forneceu calor e sais necessários para indução do ponto nuvem em fluxo, evitando um dispositivo de aquecimento externo, além da formação de um tampão na zona de amostra com pH adequado para a formação do complexo. A viabilidade do procedimento foi demonstrada pela determinação de ferro total em diferentes tipos de amostras. Esta foi a primeira aplicação da EPN em sistema com multi-impulsão e os resultados obtidos indicam que as vantagens inerentes ao emprego das microbombas solenoide foram efetivamente obtidas. O procedimento é rápido, preciso e ambientalmente amigável por explorar digestão de amostras com ácidos diluídos, substituir solventes orgânicos por surfactantes biodegradáveis, além de minimizar o consumo de reagentes e a geração de resíduos.

5. Extração em ponto nuvem em linha empregando sistema *lab-in-syringe* para a determinação de antimônio

5.1. Introdução

Antimônio é largamente empregado na indústria química como, por exemplo, na vulcanização de borracha, retardante de chama na área têxtil e na produção de plásticos, lonas de freio, adesivos, tintas, papel, pigmentos, diodos, detectores de infravermelho e vidro rubi. A dureza das ligas de antimônio as torna atrativas para a aplicação em tubulações, rolamentos e armas [176]. Além disso, devido à coloração brilhante característica, compostos de antimônio fazem parte da composição de maquiagens desde a antiguidade [177].

Em 1912, o médico brasileiro Gaspar Viana [178] observou que Sb(III) poderia ser empregado como medicamento para a cura da doença parasitária leishmaniose, iniciando assim seu emprego para fins terapêuticos. Entretanto, devido às interações e toxicidade deste íon, em 1920 passou-se a empregar Sb(V) como principal composto do medicamento, sendo utilizado até os dias atuais. Em qualquer das variações da doença, a cura ocorre com a aplicação injetável de compostos de Sb(V) durante um tratamento prolongado, não sendo reportada imunidade aos portadores da infecção [179]. Os principais portadores de leishmaniose são animais silvestres como roedores, preguiça, tamanduá e raposas, além de equinos, mulas e roedores domésticos [179]; a transmissão aos cães e seres humanos ocorre por um parasita vetor.

Antimônio pode ser encontrado em solos, águas e ar devido à intensa atividade antrópica. Além disso, incêndios florestais e erupções vulcânicas são considerada fontes naturais de poluição por antimônio [176]. Quando suspensos no ar, antimônio e seus compostos podem provocar irritações nos olhos, conjuntivite, dermatite, gastrite e doenças respiratórias como enfisema pulmonar e pneumonia [180]. Os níveis elevados no organismo podem causar anorexia, náuseas, vômitos, dores de cabeça, dores musculares e nos ossos, além de letargia [181]. Estas doenças provavelmente ocorrem porque os compostos solúveis de antimônio têm forte afinidade pelo sangue chegando a causar falência de órgãos importantes como baço, fígado e rins. Há indícios de que a morte súbita infantil esteja associada à presença de antimônio [182]. Estudos feitos em crianças que sofreram deste mal indicaram elevadas quantidades de antimônio no fígado, transmitido provavelmente pela mãe, durante a gestação, através do cordão umbilical ou na amamentação.

Por ser um poluente com efeito cumulativo, a Resolução CONAMA 357/2005 [109], a USEPA [183] e a Organização Mundial da Saúde (OMS) [184] estabeleceram limites máximos de antimônio em água potável em 5, 6 e 20 μ g L⁻¹, respectivamente. Além dos despejos industriais, a presença de antimônio em água potável também pode ocorrer pela dissolução do metal presente na composição de encanamentos e acessórios [176] ou devido à lixiviação proveniente dos recipientes que armazenam água e alimentos [196].

A técnica analítica mais empregada para a determinação de antimônio é a espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG-AAS) [180, 185-186] devido à alta sensibilidade e custo relativamente baixo [180]. Esta técnica se baseia na separação de Sb pela geração de hidretos voláteis na presença de um redutor (geralmente NaBH₄) [187], permitindo eliminar efeitos de matriz. Destaca-se, também, o emprego da espectrometria de absorção atômica com atomização com chama [188] ou eletrotérmica [189,190] na determinação de antimônio. A hifenação de técnicas, como por exemplo, a fluorescência atômica com geração de hidretos associada à separação cromatográfica (HPLC) foi explorada para especiação de antimônio orgânico e inorgânico [186]. Além disso, procedimentos baseados em potenciometria [191], voltametria [192] ou análise por ativação neutrônica [193] também têm sido reportados.

A extração líquido-líquido foi utilizada para a determinação de Sb em sistemas de análises em fluxo-batelada [194]. Uma câmara foi empregada para a extração do produto da reação entre o analito e rodamina B. Apesar de inovador pela automação da etapa de extração, o procedimento requereu um solvente orgânico (tolueno) para a extração do pariônico.

A extração em ponto nuvem tem sido empregada no preparo das amostras para a determinação de antimônio, visando aumento de seletividade e/ou de sensibilidade. Esta estratégia foi aplicada com sucesso na determinação por ICP OES [155], ICP-MS [195] e ETAAS [196], além de espectrofotometria de absorção molecular [181,197-200].

Apesar das vantagens da EPN, descritas no item 1.2.2, o processo é moroso quando realizado em batelada. Neste sentido, a mecanização utilizando sistemas de análises em fluxo tem sido muito atrativa, devido à simplicidade, facilidade de implementação, baixo custo, robustez e versatilidade.

Uma etapa importante de um procedimento analítico é a otimização das condições experimentais, que pode ser realizada pelos métodos univariado ou multivariado. A otimização multivariada fornece uma maior quantidade de informações sobre os efeitos das variáveis estudadas, bem como suas interações. A partir de modelos matemáticos é possível identificar as variáveis que geram maior resposta, o nível de significância dos fatores estudados e os valores críticos, caso existam dentro do domínio experimental selecionado. É também possível avaliar o ajuste do modelo matemático ao sistema. Dessa forma, é possível obter as melhores respostas empregando menores quantidades de reagentes, utilizando menos ensaios experimentais e, consequentemente, menor tempo do analista [201].

Nesta parte da Tese foi desenvolvido um procedimento simples, rápido, sensível e ambientalmente amigável para a determinação de antimônio empregando pioneiramente a EPN em sistema *lab-in-syringe*. O método para a determinação de antimônio baseou-se na formação de um complexo entre Sb(III) e iodeto que, em meio ácido, forma um par iônico que pode ser extraído com o surfactante Triton X-114 [181]. A otimização multivariada, com emprego de planejamentos fatorial e Box-Behnken, foi explorada para identificar os efeitos de cada variável, os efeitos de interações, os valores críticos e avaliar a robustez do procedimento desenvolvido.

5.2. Materiais e métodos

5.2.1. Equipamentos e acessórios

Para a construção do módulo de análises explorando a estratégia *lab-in-syringe* empregou-se uma seringa de 5 mL impulsionada por um motor de passos (Sciware BU 16A, Crison) acoplada a uma válvula solenoide de 3 vias na parte superior. Em uma das saídas desta válvula foi acoplada uma válvula seletora de 8 vias (Multi-burette 4S, Crison). Um computador equipado com o software AutoAnalysis 5.0 (Sciware Systems, S.L., Palma de

Mallorca, Espanha) foi utilizado para controle dos dispositivos (válvula seletora e seringa), bem como aquisição e tratamento dos dados. Tubos de extensão (d.i. 0,8 mm) e conectores de Teflon[®] também foram utilizados. Cabos de fibra óptica conduziram a radiação proveniente de uma lâmpada de deutério (Ocean Optics, modelo DH-2000-BAL) até a cela de fluxo (5 cm de caminho óptico), que foi acoplada diretamente ao espectrofotômetro CCD multicanal (Ocean Optics, modelo USB2000). Uma lente foi adaptada à entrada da cela de fluxo a fim de focalizar a radiação na área de observação.

O software STATISTICA 8.0 foi empregado para tratamento dos dados experimentais na etapa de otimização, com avaliação dos efeitos de significância relacionados a cada variável pela ANOVA, com 95 % de confiança (p = 0,05).

Para a determinação de antimônio com o procedimento de referência utilizou-se um espectrômetro de absorção atômica com gerador de hidretos (Perkin-Elmer 900Z) equipado com um auto-amostrador (AS-90) e software WinLab32 (Shelton, CT, USA).

5.2.2. Reagentes e soluções

Soluções de ácido ascórbico (AA) 1,0 mol L⁻¹ e de iodeto de potássio 4,7 mol L⁻¹ foram preparadas diariamente. Soluções de ácido sulfúrico 2,85 mol L⁻¹ e de Triton X-114 2% (m/v) foram preparadas por diluição em água.

Soluções estoque 1000 mg L⁻¹ de Sb(III) e 1000 mg L⁻¹ de Sb(V) foram preparadas por dissolução de tartarato de potássio e antimônio (C₄H₄O₇KSb.¹/₂H₂O, Carlo Erba) em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ e de piroantimonato de potássio (KSb(OH)₆, Carlo Erba) em H₂SO₄ 5,0 mol L⁻¹, respectivamente. Soluções de referência foram preparadas por diluição dos estoques em água.

As amostras de águas foram coletadas na região das Ilhas Baleares-Espanha e mantidas sob refrigeração a 4 °C, após adição de 0,1 % (m/v) de EDTA para estabilização do analito [189]. Amostras comerciais de antimoniato de meglumina, utilizadas como medicamento veterinário para tratamento da leishmaniose (valor rotulado: 300 mg mL⁻¹), foram adquiridas no comércio das Ilhas Baleares. Para o preparo, 17 µL da amostra foram

dissolvidos em 50 mL de água e as misturas foram mantidas por 10 min em banho ultrassônico [190]. Em seguida, quantidades apropriadas destas soluções foram diluídas em 50 mL de água e introduzidas no sistema de análises em fluxo.

5.2.3. Procedimento de referência

Para a avaliação da exatidão do procedimento proposto, foi empregada espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos [202]. As espécies voláteis foram geradas em um sistema de análises em fluxo com adição de NaBH₄ 0,2% (m/v) em meio de NaOH 0,05% (m/v) por confluência. Como transportador da amostra (volume = 500 μ L) foi empregado HCl 10,0 % (v/v). Um fluxo de argônio foi utilizado para transporte dos vapores desde o separador gás/líquido até a cela de quartzo do equipamento (aquecida a 900 °C por efeito Joule) e as medidas de absorção atômica foram realizadas em 217,6 nm.

5.2.4. Sistema lab-in-syringe

O módulo de análises do sistema *lab-in-syringe*, mostrado na Figura 5.1, segue a rotina de operação descrita na Tabela 5.1. Inicialmente, a válvula seletora (VS) movimentouse pelas posições de 1 a 4, sincronizada com a seringa, possibilitando a aspiração sequencial de ácido ascórbico (500 μ L), amostra (2000 μ L), Triton X-114 (100 μ L) e KI (300 μ L) (etapas 1-4). Um tempo de espera de 20 s (etapa 5) foi utilizado para favorecer a mistura das soluções dentro da seringa, a redução do analito por ácido ascórbico e a reação entre antimônio(III) e iodeto. Em seguida, a válvula movimentou-se para a posição 5 e, com a seringa ainda na posição aspiração, foi inserido 1000 μ L de H₂SO₄ diretamente na seringa (etapa 6). Na etapa 7, a seringa ficou parada por um período de 20 s para promover a separação de fases. Na próxima etapa, a válvula seletora movimentou-se para a posição 6 e todo o volume da seringa foi dispensado para o sistema de detecção (etapa 8). A etapa de limpeza (etapa 9) foi repetida 3 vezes, aspirando (SL) com a válvula solenoide (V) acionada para encher a seringa com água e dispensando o conteúdo com a válvula V desligada. Na etapa de limpeza, a válvula seletora foi mantida na posição 6 e a vazão foi mantida em 14 mL min⁻¹. Após essa etapa, o sistema estava preparado para o processamento de uma nova amostra.



Figura 5.1 - Sistema *lab-in-syringe* com EPN em linha para a determinação de antimônio. $R_1 =$ ácido ascórbico (1 mol L⁻¹); $R_2 =$ Triton X-114 (2 % m/v); $R_3 =$ iodeto de potássio (4,7 mol L⁻¹); $R_4 =$ ácido sulfúrico (2,85 mol L⁻¹); A = amostra; SL = solução de limpeza (água); VS = válvula seletora; DET = cela de fluxo (5 cm) acoplada no espectrofotômetro; S = seringa; V = válvula solenoide (linhas tracejada e contínua indicam as vias habilitadas com a válvula acionada e desligada, respectivamente); D = recipiente de descarte

Etapa	Função	Posição da válvula VS	Posição da seringa	Vazão (mL min ⁻¹)	Volume total (µL)
1 ^a	Inserção de ácido ascórbico	1	Aspirar	5,6	500
2 ^a	Inserção de amostra	2	Aspirar	7,1	2000
3 ^a	Inserção de Triton X-114	3	Aspirar	5,0	100
4 ^a	Inserção de iodeto	4	Aspirar	5,0	300
5	Tempo de espera 20 s	4	Desligada	0,0	0
6 ^a	Inserção de H ₂ SO ₄	5	Aspirar	5,0	1000
7	Tempo de espera 20 s	5	Desligada	0,0	0
8 ^a	Transporte para cela de fluxo	6	Dispensar	4,8	3900
9 ^{b,c}	Limpeza	6	Aspirar	14,0	3900
9 ^{a,c}		6	Dispensar	14,0	3900

Tabela 5.1 - Rotina de operação do sistema *lab-in-syringe* para EPN em linha para a determinação de antimônio

Válvula solenoide (V): (a) desligada ou (b) ligada; (c) etapa repetida por 3 vezes

A detecção espectrofotométrica foi realizada em 345 nm e os sinais analíticos (altura dos picos) foram baseados na diferença das absorbâncias medidas para as soluções de referência (ou amostras) e para o branco. Todos os experimentos foram realizados com os volumes de amostras e reagentes descritos na Tabela 5.1.

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Aspectos gerais

Na presença de iodeto, antimônio forma o complexo tetraiodoantimonato ([SbI₄]⁻) que apresenta máximo de absorção em 345 nm. Em meio ácido, este complexo forma um par iônico [H⁺, (SbI₄)⁻] que apresenta característica hidrofóbica e pode ser extraído em ponto nuvem [181]. Triton X-114 foi empregado para a formação do ambiente micelar que proporciona a extração do par iônico devido à formação de duas fases distintas (uma fase rica em surfactante (FRS) e uma fase aquosa contendo surfactante em concentração próxima à CMC) em temperaturas próximas à ambiente (22-25 °C [58]).

A EPN do par iônico [H⁺, (Sbl₄)⁻] foi explorada em um procedimento em batelada [181], aplicado à determinação de antimônio em água de mar, medicamento para tratamento de leishmaniose e soro de sangue humano. Limites de detecção de 0,23 μg L⁻¹ e coeficiente de variação de 3,32%, com resposta linear entre 0,80 e 95 μg L⁻¹ foram obtidos. Por outro lado, alguns inconvenientes desta proposta podem ser destacados: (i) a extração demandou aquecimento a 60 °C durante 35 min (para promover a redução de Sb(V) e formação do ponto nuvem com separação de fases); (ii) a FRS é menos densa que a fase aquosa (devido às altas concentrações de reagentes nesta fase) e permaneceu na porção superior do tubo utilizado para a extração, dificultando a separação quantitativa e (iii) é necessária a diluição da FRS com solvente (*e.g.* metanol) para redução da viscosidade antes das medidas espectrofotométricas; além de requerer solvente orgânico tóxico, a diluição diminui a concentração do analito previamente à medida.

Visando superar os inconvenientes observados no procedimento em batelada, foi proposta EPN em fluxo. A estratégia *lab-in-syringe* foi selecionada devido à versatilidade na manipulação das diferentes soluções, propiciando condições de mistura adequada. A vazão da bomba de seringa foi variada de forma a favorecer a rápida interação entre as soluções. A configuração explorada para EPN em fluxo apresentou vantagens neste aspecto uma vez que todas as soluções foram eficientemente manipuladas pelo emprego de uma única bomba e a seringa atuou como reservatório para a mistura das diferentes soluções. Desta forma, as dificuldades de mistura inerentes aos sistemas SIA, precursores da estratégia *lab-in-syringe*, foram superadas, de maneira análoga ao que ocorre nos sistemas fluxo-batelada [37].

O tempo necessário para a redução de Sb(V), formação do complexo e do par iônico e a extração do analito em ponto nuvem foi de aproximadamente 70 s, sendo 20 s para a formação do par iônico, 20 s para EPN, 20 s para a separação de fases e 10 s para a movimentação da válvula seletora nas diferentes etapas. Após a extração, a FRS foi completamente transferida para a cela de fluxo. Esta estratégia favoreceu a medida do sinal analítico, tendo em vista que o surfactante apresentava-se no topo da seringa. Além disso, o mesmo pôde ser transportado pela fase pobre em surfactante o que facilitou a limpeza do recipiente para o processamento de nova amostra. Importante salientar que a implementação desta estratégia visava também evitar o emprego de uma coluna preenchida com material filtrante para a retenção da FRS, assim como a eluição com um solvente orgânico, como é usual nos procedimentos que exploram EPN em fluxo.

O complexo com iodeto é formado pelos íons Sb(III) em solução e, objetivando a determinação da concentração total, foi necessária a adição de um agente redutor no meio reacional. Na literatura são reportados diversos procedimentos que requerem um longo período para a redução de Sb(V). Isto ocorre porque com alguns redutores, a redução da forma pentavalente de antimônio é lenta e requer aquecimento [204]. Neste trabalho, a redução dos íons Sb(V) foi realizada em linha em um período de reação relativamente curto (*ca.* 20 s), tendo sido influenciado, provavelmente pelas elevadas concentrações dos reagentes e melhores condições de mistura proporcionadas pelos sistemas *lab-in-syringe*. Além disso, a etapa de redução ocorreu concomitantemente com os processos de formação do complexo e do par iônico, EPN e separação das fases.

Os agentes redutores L-cisteína (0,5%, m/v) e hidroxilamina (10%, m/v) foram comparados com ácido ascórbico para redução de Sb(V). L-cisteína não foi eficiente para redução de Sb(V), uma vez que a resposta da solução de referência (Sb(V) 1,0 mg L⁻¹) e de branco pouco se diferenciaram (diferença < 0,05 de absorbância). Esse efeito pode ser explicado pela diminuição do potencial redutor da L-cisteína em meio com elevada acidez [203,208] e pelo reduzido tempo de contato com o analito (ca. 20 s) [204]. Alguns trabalhos [155,188,195,196,204] reportam a necessidade de aquecimento por 10 min, no mínimo, para a efetiva redução de antimônio quando L-cisteína é empregada. Em meios com elevada acidez a recomendação é empregar iodeto de potássio em conjunto com ácido ascórbico para a redução [204]. No estudo em questão, observou-se que o sinal de absorbância, referente à diferença entre a resposta para antimônio e branco foi 9 vezes maior empregando ácido ascórbico como redutor. Os sinais analíticos obtidos com hidroxilamina (0,650) como agente redutor foram semelhantes aos obtidos com o ácido ascórbico (0,690), empregando solução de Sb(V) 1 mg L⁻¹. Apesar disto, observou-se experimentalmente um aumento da resposta do branco com hidroxilamina, aspecto que inviabilizou o emprego deste redutor. Ressalte-se que a magnitude do branco é um fator crítico neste procedimento devido à contribuição do espalhamento da radiação e das concentrações elevadas dos reagentes. Desta forma, ácido ascórbico foi selecionado como agente redutor para os experimentos futuros.

A influência do aquecimento externo sobre a resposta analítica foi avaliada e os resultados estão apresentados na Figura 5.2. Pode-se observar que maior sinal analítico (0,259) foi obtido quando a temperatura do aquecedor foi 25 °C, indicando que este artifício seria dispensável. Esse efeito pode ser explicado pelo aquecimento causado pela diluição do H₂SO₄ (2,85 mol L⁻¹), que gerou o calor necessário para a formação do ponto nuvem. O calor gerado pela diluição se dissipou pela mistura no interior da seringa devido à convecção promovida pela vazão elevada (5,0 mL min⁻¹); como resultado, foi observada uma nuvem dispersa das gotículas da FRS. Em seguida, o efeito observado visualmente foi a formação de uma película opaca de surfactante, que se deslocava rapidamente para a parte superior da seringa, devido à densidade inferior à da fase pobre em surfactante. O fato de não requerer um aquecedor externo para a indução do ponto nuvem é uma vantagem do procedimento proposto. Além disso, a facilidade de manipulação das soluções (reagentes e amostras) diretamente na seringa e os menores riscos de contaminação da amostra e do analista são características atrativas desta proposta.



Figura 5.2 - Efeito da temperatura sobre as respostas da solução de Sb(III) 1 mg L⁻¹ (a) e do branco (b). Condições: KI 4,7 mol L⁻¹; AA 1 mol L⁻¹; H₂SO₄ 2,85 mol L⁻¹; Triton X-114 2,0% (m/v)

O aumento da força iônica favorece a desidratação das micelas e facilita a separação de fases sem necessariamente aumentar a eficiência da extração por ponto nuvem [58,152]. Os primeiros procedimentos empregando EPN em fluxo exploraram este aspecto para induzir o ponto nuvem sem um dispositivo de aquecimento externo [152,205]. A adição de sais na zona de amostra foi avaliada visando obter as melhores condições para implementação da EPN no sistema *lab-in-syringe* e o efeito pode ser visualizado na Figura 5.3. Para este estudo, 1% (m/v) de sal foi adicionado à solução de ácido ascórbico 1 mol L⁻¹. Observa-se um significativo aumento na magnitude do branco com a adição dos sais devido ao efeito Schlieren [167] e a diminuição do sinal analítico, provavelmente devido ao efeito dos sais sobre a formação do par iônico a ser extraído. Desta forma, a adição dos sais não propiciou melhoria na extração, já que as condições empregadas foram adequadas para a separação de fases, conforme demonstrado pela avaliação do efeito de aquecimento externo (Figura 5.2). Este comportamento é coerente com trabalhos anteriores, em que a força iônica não proporcionou melhores condições para EPN [205,206].



Figura 5.3 - Efeito da adição de sais sobre as respostas do branco (a) e da solução de Sb(III) 1 mg L⁻¹ (b). Respostas obtidas na ausência de sais (I) ou contendo 1% (m/v) de NaCl (II), Na₂SO₄ (III) ou (NH₄)₂SO₄ (IV). Condições: KI 4,7 mol L⁻¹; AA 1 mol L⁻¹; H₂SO₄ 2,85 mol L⁻¹; Triton X-114 2,0% (m/v)

Os volumes de cada solução foram fixados (conforme descrito na Tabela 5.1) para evitar diluição excessiva da zona de amostra e o resfriamento da solução, o que poderia prejudicar a formação do ponto nuvem. As vazões foram mantidas entre 5,0 a 7,0 mL min⁻¹ para evitar a formação de bolhas por diferenças acentuadas de pressão.

5.3.2. Otimização multivariada

Uma vez que os ensaios preliminares apresentaram indícios de interação entre as variáveis, planejamentos multivariados foram adotados para otimização. Inicialmente, foi realizado um *screening* empregando um planejamento fatorial completo (2⁴) para uma melhor avaliação do efeito de cada variável no sistema estudado, os possíveis efeitos de interação entre as mesmas e a indicação de valores críticos dentro do domínio experimental selecionado. As concentrações dos reagentes empregados no procedimento (ácido ascórbico, H₂SO₄, KI e Triton X-114) foram escolhidas como variáveis independentes. O sinal analítico correspondente à diferença entre a solução de referência (Sb(III) 1 mg L⁻¹) e branco foi a variável dependente.

A matriz experimental contendo os valores reais e codificados consistiu em 16 ensaios e a estes foram adicionados 4 pontos centrais para estimativa do erro experimental e avaliação da presença de curvatura. Os resultados individuais para cada ensaio, expressos como a média aritmética das triplicatas, são apresentados na Tabela 5.2.

Encaio	H_2SO_4	KI	Ácido ascórbico	Triton X-114	Sinal
Elisaio	(mol L ⁻¹)	(mol L ⁻¹)	(mol L ⁻¹)	(% <i>,</i> m/v)	analítico*
1	+ (3,90)	- (3,20)	- (0,45)	- (1,00)	0,100
2	- (1,00)	- (3,20)	- (0,45)	- (1,00)	0,170
3	+ (3,90)	- (3,20)	+ (1,81)	- (1,00)	0,223
4	- (1,00)	- (3,20)	+ (1,81)	- (1,00)	0,134
5	+ (3,90)	+ (5,80)	- (0,45)	- (1,00)	0,230
6	- (1,00)	+ (5,80)	- (0,45)	- (1,00)	0,068
7	+ (3,90)	+ (5,80)	+ (1,81)	- (1,00)	0,230
8	- (1,00)	+ (5,80)	+ (1,81)	- (1,00)	0,019
9	+ (3,90)	- (3,20)	- (0,45)	+ (3,00)	0,173
10	- (1,00)	- (3,20)	- (0,45)	+ (3,00)	0,228
11	+ (3,90)	- (3,20)	+ (1,81)	+ (3,00)	0,141
12	- (1,00)	- (3,20)	+ (1,81)	+ (3,00)	0,292
13	+ (3,90)	+ (5,80)	- (0,45)	+ (3,00)	0,247
14	- (1,00)	+ (5,80)	- (0,45)	+ (3,00)	0,168
15	+ (3,90)	+ (5,80)	+ (1,81)	+ (3,00)	0,238
16	- (1,00)	+ (5,80)	+ (1,81)	+ (3,00)	0,241
17 (C)	0 (2 <i>,</i> 45)	0 (4,50)	0 (1,13)	0 (2,00)	0,386
18 (C)	0 (2,45)	0 (4,50)	0 (1,13)	0 (2,00)	0,376
19 (C)	0 (2,45)	0 (4,50)	0 (1,13)	0 (2,00)	0,380
20 (C)	0 (2,45)	0 (4,50)	0 (1,13)	0 (2,00)	0,387

Tabela 5.2 - Matriz experimental do planejamento fatorial completo para a otimização das condições experimentais para a determinação de antimônio

(–) nível mínimo; (+) nível máximo; (0) ponto central

*referente a Sb(III) 1 mg L⁻¹, descontadas as respostas do branco

A ANOVA permite comparar médias ou grupos considerando a hipótese de que não haja diferença significativa. Os resultados da análise de variância (na Tabela 5.3) revelaram que todas as variáveis apresentaram efeito significativo (p < 0,05), tanto para os efeitos principais quanto para os efeitos de interação de segunda e terceira ordem, justificando assim o emprego da otimização multivariada [201].

Fatores	SQ	gl	MQ	F	Valor p
Curvatura	0,144755	1	0,144755	5377,899	0,000006
[H ₂ SO ₄]	0,000333	1	0,000333	12,374	0,038983
[KI]	0,002730	1	0,002730	101,426	0,002085
[AA]	0,006521	1	0,006521	242,250	0,000576
[Triton X-114]	0,034503	1	0,034503	1281,848	0,000048
[H ₂ SO ₄] x [KI]	0,012488	1	0,012488	463,953	0,000219
[H ₂ SO ₄] x [AA]	0,002998	1	0,002998	111,365	0,001818
[H ₂ SO ₄] x [Triton X-114]	0.006931	1	0,006931	257,482	0,000526
[KI] x [AA]	0,000452	1	0,000452	16,776	0,026320
[KI] x [Triton X-114]	0,006765	1	0,006765	251.334	0,000546
[AA] x [Triton X-114]	0,001073	1	0,001073	39,848	0,008035
[H ₂ SO ₄] x [KI] x [AA]	0,000541	1	0,000541	20,083	0,020720
[H ₂ SO ₄] x [KI] x [Triton X-114]	0,000856	1	0,000856	31,786	0,011041
[H ₂ SO ₄] x [AA] x [Triton X-114]	0,020664	1	0,020664	767,705	0,000103
[KI] x [AA] x [Triton X-114]	0,000028	1	0,000028	1,024	0,386100
Falta de ajuste	0,000264	1	0,000264	9,810	0,051979
Erro puro	0,000081	3	0,000027		
SQ total	0,241980	19			

Tabela 5.3 - Resultados da ANOVA para o planejamento fatorial apresentado na Tabela 5.2

AA = Ácido ascórbico; SQ = soma quadrática; gl = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = teste *F*; valor p = nível de probabilidade

Outra maneira de avaliar os resultados obtidos é através do gráfico de Pareto (Figura 5.4). Neste caso, os valores absolutos dos efeitos são estimados através de barras horizontais e uma linha vertical representa um intervalo de confiança de 95%. Efeitos que apresentam valores acima desta linha de referência são considerados significativos [207]. Esta Figura ilustra graficamente que todas as variáveis estudadas apresentaram efeito significativo, assim como os efeitos de interação de segunda e terceira ordem.



Figura 5.4 - Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial para determinação de antimônio (Triton: Triton X-114; AA: ácido ascórbico)

Segundo os dados apresentados na Tabela 5.3 e no Gráfico de Pareto (Figura 5.4), pode-se observar que o surfactante Triton X-114 apresentou o efeito mais significativo; o valor positivo indica que maiores respostas seriam obtidas em maiores níveis dessa variável. Este comportamento era esperado devido à maior capacidade de extração em elevadas concentrações de surfactante. A diluição da FRS com o aumento excessivo da concentração de surfactante não foi observada no domínio experimental avaliado. Deve-se também considerar que os sinais do branco, causados por espalhamento de radiação, aumentam com a concentração de Triton X-114.

O agente redutor apresentou um efeito principal positivo indicando que maiores respostas seriam obtidas nos níveis mais elevados, o que pode ser explicado pela baixa eficiência de redução por ácido ascórbico em meio ácido [208]. O excesso de ácido ascórbico permitiu a redução em linha de Sb(V) em um curto período, diferente do reportado anteriormente [155,188,190,191,195,196]. Entretanto, foi observado que a alta concentração de AA aumentava consideravelmente o sinal do branco (valores entre 0,500-0,600 foram obtidos nos ensaios com ácido ascórbico no nível mais elevado).

Neste sentido, 1 mol L⁻¹ de ácido ascórbico foi selecionado para os experimentos futuros, como um compromisso entre a rápida redução de Sb(V) e a magnitude do branco.

O reagente complexante KI apresentou efeito principal com valor negativo (Figura 5.4) indicando que maiores respostas serão obtidas quando este reagente for empregado nos níveis mais baixos dentro do domínio experimental. Esta hipótese foi confirmada avaliando o Gráfico das médias marginais apresentado na Figura 5.5 em que é apresentado o comportamento da variável de resposta em função das mudanças de níveis na interação entre KI e H₂SO₄. Foi possível observar que a maior resposta foi obtida na condição (a) quando H₂SO₄ encontra-se em concentrações mais elevadas e iodeto de potássio no nível mais baixo. Além disso, cabe ressaltar que iodeto em meio com acidez elevada contribui como redutor de Sb(V), favorecendo a reação de formação de complexo com os íons trivalentes [186].



Figura 5.5 - Gráfico das médias marginais para os efeitos de interação entre as variáveis ($H_2SO_4 \times KI$). (a) KI 3,2 mol L⁻¹ e (b) KI 5,8 mol L⁻¹; solução de referência: Sb(III) 1 mg L⁻¹

A exploração de planejamentos multivariados possibilita identificar as interações e prever as tendências das variáveis. Como exemplo, pode-se considerar o efeito da acidez. A

concentração de H₂SO₄ teve o efeito principal menos significativo (Figura 5.4), apresentando efeito negativo, o que propõe que quanto mais baixa a sua concentração, maior seria a resposta. Entretanto, apesar do seu efeito principal ser marginalmente significativo, os efeitos de interação, incluindo as de segunda e terceira ordem são muito significativos, indicando que maiores respostas serão obtidas com a acidez no nível mais alto, comportamento que poderia não ter sido identificado por otimização univariada.

O Gráfico das médias marginais representado na Figura 5.6 indica a interação de terceira ordem de três variáveis (H₂SO₄, AA e Triton X-114) frente aos níveis de concentração. Esta interação merece destaque uma vez que apresentou a maior significância, visualmente observada no Gráfico de Pareto (Figura 5.4), com efeito superior aos valores dos efeitos das variáveis principais. Além da concentração de H₂SO₄, a Figura 5.6 também indica os níveis mais elevados de surfactante e ácido ascórbico como ótimos. Entretanto, é necessário considerar a limitação operacional, uma vez que estes reagentes, em concentrações elevadas, aumentaram a resposta do branco.



Figura 5.6 - Gráfico das médias marginais para os efeitos de interação de terceira ordem entre as variáveis ($H_2SO_4 \times AA \times Triton \times 114$) na determinação de antimônio. (a) $H_2SO_4 \times 1,0$ mol L⁻¹ e (b) H_2SO_4 3,9 mol L⁻¹; (I) Triton $\times 114 \times 1\%$ (m/v); (II) Triton $\times 114 \times 1\%$ (m/v); solução de referência Sb(III) 1 mg L⁻¹

O planejamento fatorial indicou também um efeito de curvatura bastante significativo, apresentado na ANOVA (Tabela 5.3) e que pode ser visualizado no Gráfico de Pareto (Figura 5.4), com o maior valor de significância dentro do domínio avaliado. Isto é indício de que os valores críticos poderão ser encontrados dentro do domínio experimental empregando um modelo matemático mais complexo para a otimização. Esta informação é confirmada pela indicação de falta de ajuste apresentada na mesma Tabela 5.3, e pela indicação de curvatura de acordo com a Eq. 5.1:

$$Curvatura = R_{EX} - R_{PC}$$
(Eq. 5.1)

onde, R_{EX} se refere à média das respostas obtidas a partir dos experimentos realizados para o planejamento fatorial e R_{PC} se refere à média das respostas obtidas para o ponto central. A análise dos resultados, $R_{EX} = 0,181$ e $R_{PC} = 0,382$, sugeriu uma curvatura negativa (-0,201) que indica a existência de uma região máxima de sinal de absorbância próxima das condições experimentais do ponto central.

Considerando-se estas informações, optou-se por empregar um planejamento Box-Behnken como modelo matemático quadrático para a obtenção de superfícies de resposta que permitiriam identificar os valores críticos. Este modelo foi aplicado considerando as variáveis mais significativas indicadas no planejamento fatorial (Triton X-114, KI e H₂SO₄). A matriz dos ensaios contendo os valores reais e codificados está apresentada na Tabela 5.4, com as respostas obtidas experimentalmente. A esse planejamento foram adicionados 2 pontos centrais para a estimativa do erro puro. A concentração de ácido ascórbico foi fixada em 1,0 mol L⁻¹, como um compromisso entre a resposta analítica e a magnitude do branco.

Ensaio	H_2SO_4	KI	Triton X-114	Sinal analítico*
LIISalo	(mol L ⁻¹)	(mol L⁻¹)	(% <i>,</i> m/v)	Sinaranancico
1	- (0,80)	- (4,40)	0 (2,10)	0,029
2	+ (3,50)	- (4,40)	0 (2,10)	0,245
3	- (0,80)	+ (5,50)	0 (2,10)	0,028
4	+ (3,50)	+ (5,50)	0 (2,10)	0,314
5	- (0,80)	0 (4,90)	- (1,10)	0,030
6	+ (3,50)	0 (4,90)	- (1,10)	0,235
7	- (0,80)	0 (4,90)	+ (3,10)	0,037
8	+ (3,50)	0 (4,90)	+ (3,10)	0,185
9	0 (2,10)	- (4,40)	- (1,10)	0,213
10	0 (2,10)	+ (5,50)	- (1,10)	0,215
11	0 (2,10)	- (4,40)	+ (3,10)	0,081
12	0 (2,10)	+ (5,50)	+ (3,10)	0,086
13 (C)	0 (2,10)	0 (4,90)	0 (2,10)	0,328
14 (C)	0 (2,10)	0 (4,90)	0 (2,10)	0,309
15 (C)	0 (2,10)	0 (4,90)	0 (2,10)	0,304

Tabela 5.4 - Matriz experimental para o planejamento Box-Behnken para a otimização do procedimento

(-) nível mínimo; (+) nível máximo; (0) ponto central

*referente a Sb(III) 1 mg L⁻¹, descontadas as respostas do branco

A ANOVA dos resultados (Tabela 5.5) indica um modelo bem ajustado, com alto coeficiente de correlação e baixo valor do erro puro, para um nível de confiança de 95% (p=0,05). Os resultados apresentaram valores críticos de máxima resposta para os 3 fatores estudados dentro do domínio experimental (Tabela 5.6), expressos como valores reais. Estes valores correspondem às concentrações de H₂SO₄ 0,74 mol L⁻¹; KI 0,38 mol L⁻¹ e Triton X-114 0,05 % (m/v) no interior da seringa (*i.e.* após correção dos efeitos de diluição). O modelo matemático que evidencia o compromisso entre as variáveis e a resposta analítica estão expressos na Eq. 5.2 em termos de valores codificados (os valores em vermelho representam os coeficientes das variáveis que foram significativos dentro do sistema).

Sinal analítico = $0,3137 + 0,1069[H_2SO_4] - 0,0933[H_2SO_4]^2 + 0,0094[KI] - 0,0663[KI]^2 - 0,0380[Triton X-114] - 0,0986[Triton X-114]^2 + 0,0175[H_2SO_4]x[KI] - 0,0143[H_2SO_4]x[Triton X-114] + 0,0008[KI]x[Triton X-114] (Eq. 5.2)$

As superfícies de respostas apresentadas na Figura 5.7 evidenciam as regiões de valores críticos para o sistema. Pelo gráfico dos valores observados em função dos previstos (5.7-d) pode-se observar o bom ajuste do modelo matemático selecionado.

Tabela 5.5 - Resultados da ANOVA para o planejamento Box-Behnken apresentado naTabela 5.4

Fatores	SQ	gl	MQ	F	Valor p
[H ₂ SO ₄] L+Q	0,123542	2	0,061771	385,2668	0,002589
[KI] L+Q	0,016950	2	0,008475	52,8577	0,018567
[Triton X-114] L+Q	0,047436	2	0,023718	147,9304	0,006715
[H ₂ SO ₄] x [KI]	0,001225	1	0,001225	7,6403	0,109754
[H ₂ SO ₄] x [Triton X-114]	0,000812	1	0,000812	5,0660	0,153268
[KI] x [Triton X-114]	0,000002	1	0,000002	0,0140	0,916527
Perda de ajuste	0,009181	3	0,003060	19,0868	0,050194
Erro puro	0,000321	2	0,000160		
SQ total	0,188709	14			

L = termo linear; Q = termo quadrático; SQ = soma quadrática; gl = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = teste-F; Valor p = nível de probabilidade

Tabela 5.6 - Valores críticos obtidos na otimização Box-Behnken

Fator (variável independente)	Valores críticos
H ₂ SO ₄	2,93 mol L ⁻¹
KI	5,03 mol L ⁻¹
Triton X-114	1,86 % (m/v)



Figura 5.7 - Superfícies de resposta (a) KI x H_2SO_4 ; (b) Triton X-114 x H_2SO_4 (c) Triton X-114 x KI e (d) valores previstos x observados obtidas com o planejamento Box-Behnken

A concentração de H_2SO_4 0,74 mol L⁻¹ empregada neste procedimento é semelhante à usada no procedimento em batelada (0,8 mol L⁻¹), mas a concentração de Triton X-114 foi 8 vezes menor e a de ácido ascórbico e KI foram reduzidas em 35% e 50%, respectivamente. A concentração de Triton X-114 (0,05%, m/v) é *ca*. 2,5 vezes maior que a concentração micelar crítica (CMC) [149].

Com todos os parâmetros otimizados, os valores críticos foram tomados como ótimos e a esses foi aplicado um teste de robustez, considerando uma variação de 5%, em um planejamento fatorial completo para 3 variáveis, com 3 pontos centrais. A matriz do planejamento contendo os valores reais e codificados são apresentados na Tabela 5.7. De acordo a análise de variância (Tabela 5.8), o sistema otimizado é robusto. Pode-se observar que nenhum dos fatores apresentou valor significativo dentro do domínio experimental para um nível de confiança de 95%. Esses resultados também podem ser visualizados no gráfico de Pareto (Figura 5.8), que mostra que todos os fatores, assim como os efeitos de interação de segunda e terceira ordens, não foram significativos.

Tabela 5.7 - Matriz experimental do planejamento fatorial para avaliação da robustez do sistema com 5 % de variação

	H ₂ SO ₄	KI	Triton X-114	Cinal analítica*
Elisaio	(mol L ⁻¹)	(mol L⁻¹)	(%, m/v)	
1	- (2,76)	- (4,75)	- (1,80)	0,204
2	+ (3,05)	- (4,75)	- (1,80)	0,241
3	- (2,76)	+ (5,25)	- (1,80)	0,209
4	+ (3,05)	+ (5,25)	- (1,80)	0,199
5	- (2,76)	- (4,75)	+ (2,00)	0,213
6	+ (3,05)	- (4,75)	+ (2,00)	0,190
7	- (2,76)	+ (5,25)	+ (2,00)	0,203
8	+ (3,05)	+ (5,25)	+ (2,00)	0,204
9 (C)	0 (2,90)	0 (5,00)	0 (1,90)	0,209
10 (C)	0 (2,90)	0 (5,00)	0 (1,90)	0,202
11 (C)	0 (2,90)	0 (5,00)	0 (1,90)	0,199

(-) nível mínimo; (+) nível máximo; (0) ponto central.

*referente a Sb(III) 1 mg L⁻¹, descontadas as respostas do branco

Tabela 5.8 - ANOVA do planejamento fatorial para avaliação da robustez na determinação de antimônio

Fatores	SQ	gl	MQ	F	Valor p
Curvatura	0,0000	1	0,0000	0,0023	0,9661
[H ₂ SO ₄]	0,0001	1	0,0001	4,2721	0,1747
[KI]	0,0000	1	0,0000	0,0190	0,9030
[Triton X-114]	0,0000	1	0,0000	0,3038	0,6369
[H ₂ SO ₄] x [KI]	0,0000	1	0,0000	0,6835	0, 4953
[H ₂ SO ₄] x [Triton X-114]	0,0000	1	0,0000	0,9304	0,4365
[KI] x [Triton X-114]	0,0000	1	0,0000	0,1709	0,7194
[H ₂ SO ₄] x [KI] x [Triton X-114]	0,0002	1	0,0002	6,1519	0,1313
Erro puro	0,0001	2	0,0000		
SQ total	0,0004	10			

SQ = soma quadrática; gl = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = teste-*F*; Valor p = nível de probabilidade



Figura 5.8 - Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial para o teste de robustez do procedimento otimizado (variação de 5%) para a determinação de antimônio

5.4. Características analíticas e aplicação do procedimento

O procedimento otimizado apresentou resposta linear entre 5,0 e 50,0 μ g L⁻¹, descrita pela equação S = 0,137 + 0,050 C_{Sb} (r = 0,998). Os sinais transientes e a curva analítica correspondente estão apresentados na Figura 5.9. A ausência de efeitos de memória e a estabilidade da linha de base evidenciam a eficiência da limpeza da seringa e da cela de fluxo.



Figura 5.9 - Sinais transientes e curva analítica obtidos com sistema *lab-in-syringe* para EPN de antimônio em linha. As condições empregadas foram: AA 1,0 mol L⁻¹ (500 μ L); amostra (2000 μ L); KI 4,7 mol L⁻¹ (300 μ L); H₂SO₄ 2,85 mol L⁻¹ (1000 μ L); Triton X-114 2,0% (m/v) (100 μ L); solução de limpeza: água. Números sobre os sinais transientes indicam as concentrações de antimônio em μ g L⁻¹

O limite de detecção (99,7% de confiança), coeficiente de variação (n = 5; 15,0 μ g L⁻¹) e a frequência de amostragem foram estimados em 1,8 μ g L⁻¹, 1,6 % e 16 determinações h⁻¹, respectivamente. A absortividade molar aparente foi estimada em 3,1 x 10⁶ L mol⁻¹ cm⁻¹ e o fator de enriquecimento de 25 foi calculado pela razão das curvas de calibração obtidas na presença e ausência de surfactante [70].

O efeito das espécies concomitantes foi avaliado por comparação das respostas analíticas na presença e ausência de diversas espécies (Tabela 5.9). Nenhuma das espécies avaliadas interferiu na determinação de antimônio (variação dos sinais < 6%). As quantidades toleráveis de Cd(II), Hg(II) e Bi(III) foram 2,5; 6 e 10 vezes maiores do que observado no procedimento em batelada, provavelmente devido a efeitos cinéticos (*i.e.* ao baixo tempo de residência empregado no procedimento em fluxo explorando *lab-in-syringe*). As quantidades toleráveis são significativamente maiores que as esperadas em amostras de águas naturais demonstrando, portanto, a aplicabilidade do procedimento.

Além disso, uma vez que as amostras de águas de rio e chuva não apresentaram quantidades de antimônio mensuráveis, adições de 10,0 e 25,0 μ g L⁻¹ de Sb foram realizadas e as recuperações de antimônio ficaram entre 99 e 110%, demonstrando a ausência de efeito de matriz.

Espécies	Concentração (µg L⁻¹)	Variação do sinal (%)
Solução multielementar*	1000	+3,5
Cd(II)	1000	-1,5
Hg(II)	500	-6,0
Bi(III)	10	-2,6

Tabela 5.9 - Efeito das espécies concomitantes na determinação de antimônio

*Al(III), As(III), B(III), Ba(II), Cd(II), Co(II), Cr(III), Cu(II), Fe(II), Mn(II), Mo(II), Ni(II), Pb(II), V(V) e Zn(II)

As características analíticas do procedimento desenvolvido foram comparadas com as obtidas em outros procedimentos para a determinação de antimônio com EPN (Tabela 5.10). Esses procedimentos exploraram extração em batelada, incluindo o procedimento desenvolvido por Li et al. [155] que empregou o sistema em fluxo apenas para separação e eluição da fase rica. Tais procedimentos empregaram grandes volumes de amostra (de 6 a 100 mL) como estratégia para diminuir os limites de detecção e aumentar os fatores de enriquecimento [181,188,190,195,196,200]. Como consequência, baixa frequência analítica é obtida nos procedimentos em fluxo, o que os diferencia do procedimento proposto. A mecanização também conferiu maior frequência de amostragem em relação aos procedimentos que exploram extração em ponto nuvem em batelada.

Tal como discutido no Capítulo 4, o fator de enriquecimento (FE) não proporciona informação adequada sobre a eficiência do procedimento, uma vez que não considera o tempo e o volume gastos na etapa de concentração. Alternativamente, pode-se considerar a eficiência de concentração (EC) e o índice de consumo (IC). Com base na EC, definida como o fator de enriquecimento de um analito em um minuto, pode-se concluir que o procedimento proposto encontra-se entre os mais eficientes (EC = 6,67 min⁻¹) dentre aqueles listados na

Tabela 5.10. O mesmo se reflete no IC, que estima a eficiência do consumo da amostra em procedimentos que empregam pré-concentração [70]. Na comparação entre os procedimentos mostrados na Tabela 5.10, observa-se que um dos menores valores (IC = 0,08 mL) foi obtido no procedimento proposto.

O procedimento proposto emprega detecção por espectrofotometria de absorção molecular, que é uma técnica de custo relativamente baixo, e reagentes comuns em laboratórios químicos. Procedimentos que apresentam menores limites de detecção que aquele alcançado no presente procedimento empregaram técnicas de detecção mais sensíveis (*e.g.* ETV-ICP-MS e ETV-ICP OES), mas com equipamentos de elevado custo de manutenção e de operação.

FI-ETV-ICP OES*Água de rio e de torneira e urina0,091872100Redicamento para e urinaMedicamento para e urinaMedicamento para e urina1,520051Repectrofotometrialeishmaniose, água do0,231,520051mar, soro humano fAASÁgua do mar sintética, água de descarte2,0834510FAASÁgua do mar sintética, água de descarte2,0835010ABASMau amineral de rio e do asnguíneo0,031,335010ETAASTubos plásticos, copo plásticos, fau0,031,335010EspectrofotometriaPlasma sanguíneo, urina0,0542010Fiégua de rio, de chuva e fi0,0542010Fiégua de rio, de chuva e fi1,8162522	(h ⁻¹) FE 1	Va (mL) EC (min ⁻¹)	IC (mL) CV (%) Referência
Medicamento para Medicamento para Espectrofotometria leishmaniose, água do 0,23 1,5 200 51 mar, soro humano mar, soro humano mar, soro humano 3 45 10 FAAS água do mar sintética, soro 2,08 3 45 10 FAAS água do mar sintética, soro 0,08 0,92 229 12 Água mineral de rio e do mar sintética, soro 0,03 1,33 50 10 FTAAS mar sintética, soro 0,03 1,33 50 10 ETV-ICP-MS Água 0,03 1,33 50 10 ETV-ICP-MS Tubos plásticos, 0,03 1,33 50 10 ETV-ICP-MS Tubos plásticos, 0,03 1,33 50 10 FTAAS recipiente de cerâmica, 0,03 1,33 17,5° 6 Espectrofotometria Plasma sanguíneo, urina 0,05 4 20 10 FI- Água de rio, de chuva e 1,8 16 25 2 FI- égua de rio, de chuva e <td>1 872</td> <td>100 14,5</td> <td>0,11 4,3</td> <td>[155]</td>	1 872	100 14,5	0,11 4,3	[155]
FAASmar, soro humanoFAASÁgua do mar sintética, água de descarte34510Água de descarte2,0834510Água mineral de rio e do0,080,9222912FIAASmar sintética, soro0,031,335010ETV-ICP-MSÁgua0,031,335010ETV-ICP-MSTubos plásticos,0,021,3317,5°6.ETAASrecipiente de cerâmica,0,021,3317,5°6.ETAASrecipiente de cerâmica,0,0542010EspectrofotometriaPlasma sanguíneo, urina0,0542010FI-Água de rio, de chuva e1,816252	,5 200	51 5,0	0,255 3,3	2 [192]
Água mineral de rio e doETAASmar sintética, soro0,080,9222912sanguíneo0,031,335010ETV-ICP-MSÁgua0,031,335010Tubos plásticos,0,021,3317,5 ^b 6.ETAASrecipiente de cerâmica,0,021,3317,5 ^b 6.EspectrofotometriaPlasma sanguíneo, urina0,0542010FI-Água de rio, de chuva e1,816252	3 45	10 2,25	0,222 2,2	[199]
ETAASmar sintética, soro0,080,9222912sanguíneosanguíneo1,335010ETV-ICP-MSÁgua0,031,335010Tubos plásticos,0,021,3317,5 ^b 6.ETAASrecipiente de cerâmica,0,021,3317,5 ^b 6.copo plástico de água0,0542010EspectrofotometriaPlasma sanguíneo, urina0,0542010Fl-Água de rio, de chuva e1,816252				
sanguíneo ETV-ICP-MS Água 0,03 1,33 50 10 Tubos plásticos, Tubos plásticos, 0,02 1,33 17,5 ^b 6. ETAAS recipiente de cerâmica, 0,02 1,33 17,5 ^b 6. copo plástico de água 0,05 4 20 10 Fl- Água de rio, de chuva e 0,05 4 20 10	92 229	12 3,51	0,05 4,0	[201]
ETV-ICP-MS Água 0,03 1,33 50 10 Tubos plásticos, Tubos plásticos, 1,33 17,5 ^b 6. ETAAS recipiente de cerâmica, 0,02 1,33 17,5 ^b 6. copo plástico de água 0,05 4 20 10 Espectrofotometria Plasma sanguíneo, urina 0,05 4 20 10 Fl- Água de rio, de chuva e 1,8 16 25 2				
Tubos plásticos, Tubos plásticos, ETAAS recipiente de cerâmica, 0,02 1,33 17,5 ^b 6. copo plástico de água 0,02 1,33 17,5 ^b 6. Espectrofotometria Plasma sanguíneo, urina 0,05 4 20 10 Fl- Água de río, de chuva e 1,8 16 25 2	,33 50	10 1,11	0,2 4,2	[206]
ETAAS recipiente de cerâmica, 0,02 1,33 17,5° <u>6.</u> copo plástico de água Espectrofotometria Plasma sanguíneo, urina 0,05 4 20 10 Fl- Água de rio, de chuva e t- de poço, medicamento 1,8 16 25 2				
copo plástico de água Espectrofotometria Plasma sanguíneo, urina 0,05 4 20 10 Fl- Água de rio, de chuva e Fl- de poço, medicamento 1,8 16 25 2	,33 17,5 ^b	6. 0,39	0,342 7,8	[207]
Espectrofotometria Plasma sanguíneo, urina 0,05 4 20 10 Água de rio, de chuva e Fl- de poço, medicamento 1,8 16 25 2				
Fl- Água de rio, de chuva e de poço, medicamento 1,8 16 25 2	4 20	10 1,33	0,5 2,7	[211]
de poço, medicamento 1,8 16 25 2				ł
	16 25	2 6,67	0,08 1,6	proporta
espectationomication para leishmaniose				picodo id

Tabela 5.10 - Características analíticas de procedimentos para a determinação de antimônio explorando EPN

sma acoplado indutivamente; ETAAS: espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica; FA: frequência analítica (estimada considerando o tempo gasto por determinação); FAAS: espectrometria de absorção atômica com chama; FE: fator de enriquecimento; FI-espectrofotometria: sistema de análises em fluxo com espectrofotometria; FI-ETV-ICP OES: sistema de análises em fluxo com espectrometria de emissão óptica com atomização eletrotérmica e fonte de plasma acoplado indutivamente; IC: índice de consumo; LD: limite de detecção; Va: volume de amostra S

*EPN realizada em batelada; ^bFE foi estimado do limite de detecção encontrado com e sem EPN

Vale ressaltar que o fator de enriquecimento obtido é um dos maiores encontrados em relação aos procedimentos de EPN em fluxo (Capítulo 4, Tabela 4.4). Outra vantagem desta proposta é a precisão elevada devido à mecanização de todas as etapas para a EPN em fluxo.

O procedimento proposto foi aplicado à determinação de antimônio em amostras de medicamento para tratamento da leishmaniose (Tabela 5.11) e águas naturais (Tabela 5.12). Todas as respostas foram concordantes com o procedimento de referência que emprega espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos [202], com 95 % de confiança.

Tabela	5.11 ·	- Valores	médios	e i	ncertezas	(n=3)	para	а	determinação	de	antimônio	em
medica	mento	os para leis	shmanios	e								

	Sb (mg mL ⁻¹)*	
Amostra	Procedimento proposto	Procedimento de referência [202]
1	262 ± 25	291 ± 35
2	273 ± 5	248 ± 17
3	247 ± 38	243 ± 11
4	$\textbf{252} \pm \textbf{11}$	$\textbf{241}\pm\textbf{7}$

*amostras analisadas após diluição de 6x10⁶ vezes

Tabela 5.12 - Valores médios e incertezas (n=3) para a determinação de antimônio em amostras de águas naturais

	Sb (μg L ⁻¹)*	
Amostra	Procedimento proposto	Procedimento de referência [202]
Rio I	4,3±0,5	4,1±0,3
Rio II	$\textbf{16,1}\pm\textbf{0,9}$	15,3±1,3
Chuva	14 ± 1	13 ± 2
Роçо	$\textbf{15,7}\pm\textbf{0,3}$	15 ± 2

* após adição de 5 ou 15 μ g L⁻¹

5.5. Conclusões

O procedimento desenvolvido resultou da pioneira exploração da extração em ponto nuvem em sistema *lab-in-syringe* e foi eficientemente aplicado à determinação de antimônio em águas naturais e medicamentos para leishmaniose. Este acoplamento apresentou diversas vantagens em relação a outros procedimentos descritos na literatura, como: (i) a mecanização de todas as etapas de EPN; (ii) a possibilidade de realizar extração líquidolíquido evitando solventes orgânicos; (iii) facilidade de misturar eficientemente 5 soluções; (iv) minimização dos riscos de contaminação pela manipulação das soluções e amostras em sistema fechado e (v) medidas analíticas realizadas diretamente na fase rica, sem requerer uma etapa de retenção da FRS e posterior eluição com solvente orgânico. A diluição da solução de ácido sulfúrico durante a etapa de amostragem proporcionou o calor suficiente para indução do ponto nuvem, evitando o emprego de um dispositivo de aquecimento externo.

Em comparação com o procedimento em batelada para a determinação de antimônio, tanto a seletividade, quanto o aproveitamento da amostra foram significativamente maiores, com um tempo reduzido de determinação. A otimização do procedimento empregando modelos multivariados (planejamento fatorial e planejamento Box-Behnken) foi aplicada com sucesso para identificar os efeitos de interação, encontrar os valores críticos dentro do domínio experimental explorado e comprovar a robustez.

Dessa forma, pode-se concluir que o procedimento proposto é rápido, limpo, sensível e completamente automatizado sendo adequado para a determinação de antimônio em análises de rotina, além de atender à legislação ambiental [109].

6. CONCLUSÕES FINAIS

Nesta Tese foi demonstrada a versatilidade e potencialidade dos sistemas em fluxo com multi-impulsão e *lab-in-syringe* para a automatização de procedimentos de separação em fluxo como difusão gasosa e extração em ponto nuvem.

O fluxo pulsado gerado pelas microbombas solenoide favoreceu as condições de mistura e a transferência de massa (e calor) melhorando significativamente as características analíticas dos procedimentos desenvolvidos, incrementando a eficiência da difusão gasosa e da extração em ponto nuvem em fluxo.

Um procedimento automatizado com multi-impulsão rápido e simples foi desenvolvido para a determinação de cianeto dissociável em ácidos em amostras de águas naturais. O uso das microbombas solenoide combinado com a espectrofotometria de longo caminho óptico incrementou significativamente a sensibilidade, alcançando os limites estabelecidos pelos órgãos oficiais (*e.g.* CONAMA) para a quantificação de cianeto em águas naturais (classe I), com reduzida geração de efluente (2,6 mL por determinação). Pela primeira vez foi explorada uma cela de longo caminho óptico para descolorimetria. A etapa de difusão gasosa melhorou significativamente a seletividade do procedimento, além de evitar a liberação de gases tóxicos (HCN), sem contaminação para o ambiente e com proteção do analista. Um tratamento da amostra com H₂O₂ foi proposto para evitar a interferência de sulfeto.

A automatização da extração em ponto nuvem com os sistemas de multi-impulsão foi realizada com sucesso sem requerer uma etapa adicional de retenção e eluição da fase rica em surfactante, diferente dos procedimentos reportados anteriormente. A inovação consistiu em realizar as medidas diretamente na fase rica em surfactante, retida momentaneamente no caminho óptico. O calor gerado pela neutralização em linha induziu a formação do ponto nuvem evitando o uso de um dispositivo externo de aquecimento. Os índices de consumo e eficiência de concentração foram equivalentes ou superiores aos obtidos em outros procedimentos que exploram pré-concentração. O procedimento proposto é rápido, preciso, eficaz e ambientalmente amigável por explorar amostras digeridas com ácidos diluídos, substituir os solventes orgânicos por surfactantes, que são

menos agressivos ao ambiente, e pode ser aplicado à determinação de ferro em matrizes relativamente complexas como materiais vegetais digeridos.

A extração em ponto nuvem em fluxo foi pela primeira vez empregada na abordagem inovadora *lab-in-syringe* para a determinação de antimônio em águas e medicamentos para leishmaniose. A utilização desta técnica apresentou numerosas vantagens como mecanização das etapas de EPN em batelada, melhores condições de mistura das soluções dentro da seringa e redução dos riscos de contaminação, com medidas de absorbância diretamente sem retenção em filtro ou eluição da fase rica. O calor gerado pela diluição do ácido sulfúrico concentrado evitou o emprego de um dispositivo de aquecimento externo para gerar o ponto nuvem. Em comparação com o método em batelada e outros procedimentos, esta abordagem é atraente e se destaca em relação aos índices de consumo e de eficiência de concentração.

REFERÊNCIAS

1. KRONKA, E.A.M.; REIS, B.F.; VIEIRA, J.A.V.; BLANCO, T.; GERVASIO, A.P.G. Multicomutação e amostragem binária em análise química em fluxo. Determinação espectrofotométrica de ortofosfato em águas naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 372-378, 1997.

2. REIS, B.F.; GINÉ, M.F.; KRONKA, E.A.M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 82-91, 1989.

3. TROJANOWICZ, M. Advances in flow analysis. Weinheim: Wiley-VHC, 2008.

4. LAPA, R.A.S.; LIMA, J.L.F.C.; REIS, B.F.; SANTOS, J.L.M.; ZAGATTO, E.A.G. Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 466, p. 125-132, 2002.

5. CERDÀ, A.; CERDÀ, V. An introduction to flow analysis. Palma de Mallorca: SCIWARE, 2009. 43 p.

6. VONGBOOT, M.; SUESOONTHON, M. Removal of copper and iron by polyurethane foam column in FIA system for the determination of nickel in pierced ring. **Talanta**, London, v. 131, p. 325-329, 2015.

7. TYMECKI, L.; REJNIS, M.; POKRZYWNICKA, M.; STRZELAK, K.; KONCKI, R. Fluorimetric detector and sensor for flow analysis made of light emitting diodes. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 721, p. 92-96, 2012.

8. CALATAYUD, J.M.; GARCIA MATEO, J.V. FIA determination of chlorhexidine by means of the precipitation with Cu(II). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 7, n. 12, p. 1441-1445, 1989.

9. ROVER JUNIOR, L.; GARCIA, C.A.B.; NETO, G.O.; KUBOTA, L.T.; GALEMBECK, F. Acetylsalicylic acid determination in pharmaceutical samples by FIA-potentiometry using a salicylate-sensitive tubular electrode with an ethylene-vinyl acetate membrane. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 366, n. 1-3, p. 103-109, 1998.

10. ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Recent developments in flow-analysis vibrational spectroscopy. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 26, n. 8, p. 775-787, 2007.

11. GALLIGNANI, M.; BRUNETTO, M.R. Infrared detection in flow analysis — developments and trends (review). **Talanta**, London, v. 64, n. 5, p. 1127-1146, 2004.

12. ARMENTA, S.; QUINTÁS, G.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Mid-infrared and Raman spectrometry for quality control of pesticide formulations. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 24, n. 8, p. 772-781, 2005.

13. ZAGATTO, E.A.G.; OLIVEIRA, C.C.; TOWNSHEND, A.; WORSFOLD, P.J. **Flow analysis with spectrophotometric and luminometric detection.** 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2012. 472 p.

14. LAPA, R.A.S.; LIMA, J.L.F.C.; SANTOS, J.L.M. Determination of calcium, magnesium, sodium and potassium in wines by FIA using an automatic zone sampling system. **Food Chemistry**, Barking, v. 55, n. 4, p. 397-402, 1996.

15. NÓBREGA, J.A.; MOZETO, A.; ALBERICI, R.M.; GUIMARÃES, J.L. A flow injection spectrophotometric determination of ammonium in natural water. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 6, n. 4, p. 327-330, 1995.

16. LAZARO F.; LUQUE DE CASTRO, M.D.; VALCÁRCEL, M. Novel strategies in flow-injection analysis. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, Oxford, v. 6, n. 6-8, p. 585-598, 1998.

17. ROCHA, F.R.P.; REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.L.F.C.; LAPA, R.A.S.; SANTOS, J.L.M. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 468, p. 119-131, 2002.

18. REIS, B.F.; GINÉ, M.F.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.L.F.C.; LAPA, R.A. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 293, n. 1–2, p. 129-138, 1994.

19. ICARDO, M.C.; GARCIA MATEO, J.V.; CALATAYUD, J.M. Multicommutation as a powerful new analytical tool. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 21, n. 5, p. 366-378, 2002.

20. CERDÀ, V.; PONS, C. Multicommuted flow techniques for developing analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 236-242, 2006.

21. LAVORANTE, A.F.; PIRES, C.K.; REIS, B.F. Multicommuted flow system employing pinch solenoid valves and micro-pumps: Spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 42, n. 4, p. 423-429, 2006.

22. ALVES, E.R.; FERES, M.A.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.L.F.C. Exploiting pulsed flows for heating improvement: application to determination of total reducing sugars in molasses and sugar-cane juices. **Current Analytical Chemistry**, Beijing, v. 5, p. 65-69, 2009.

23. LIMA, J.L.F.C.; SANTOS, J.L.M.; DIAS, A.C.B.; RIBEIRO, M.F.T.; ZAGATTO, E.A.G. Multipumping flow systems: an automation tool. **Talanta**, London, v. 64, n. 5, p. 1091-1098, 2004.

24. BIO-CHEM FLUIDCS. **What is a Solenoid Operated Micro-Pump**? Boonton, NJ, 2014. [online] Disponível em: http://www.biochemfluidics.com/Products/micro-pumps.asp. Acesso em: 22 set 2014.

25. HORSTKOTTE, B.; LEDESMA, E.; DUARTE, C.M.; CERDÀ, V. Improving pressure robustness, realiability, and versatility of solenoid pump flow system using a miniature economic control unit including two simple pressure pulse mathematical models. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 82, n. 16, p. 6983-6990, 2010.

26. RÓDENAS-TORRALBA, E.; MORALES-RUBIO, A.; LAVORANTE, A.F.; REIS, B.F.; DE LA GUARDIA, M. Micropumping multicommutation turbidimetric analysis of waters. **Talanta**, London, v. 73, n. 4, p. 742–747, 2007.

27. WEEKS, D.A.; JOHNSON, K.S. Solenoid pumps for flow injection analysis. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 68, n. 15, p. 2717-2719, 1996.
28. SILVA, S.G.; NÓBREGA, J.A.; ROCHA, F.R.P. Exploiting Mn(III)/EDTA complex in a flow system with solenoid micro-pumps coupled to long pathlength spectrophotometry for fast manganese determination. **Microchemical Journal**, New York, v. 98, n. 1, p. 109-114, 2011.

29. PINTO, P.C.A.G.; SARAIVA, M.L.M.F.S.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. A pulsed sequential injection analysis flow system for the fluorimetric determination of indomethacin in pharmaceutical preparations. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 539, p. 173-179, 2005.

30. MELCHERT, W.R.; ROCHA, F.R.P. An improved procedure for flow-based turbidimetric sulphate determination based on a liquid core waveguide and pulsed flows. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 616, n. 1, p. 56-62, 2008.

31. CERDÀ, V.; ESTELA, J.M.; FORTEZA, R.; CLADERA, A.; BECERRA, E.; ALTIMIRA, P.; SITJAR, P. Flow techniques in water analysis. **Talanta**, London, v. 50, p. 695-705, 1999.

32. BAUANUAM, J.; MIRÓ, M.; HANSEN, E.H.; SHIOWATANA, J.; ESTELA, J.M.; CERDÀ, V. A multisyringe flow-through sequential extraction system for on-line monitoring of orthophosphate in soils and sediments. **Talanta**, London, v. 71, p. 1710-1719, 2007.

33. RUZICKA, J.; MARSHALL, G.D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 237, p. 329-343, 1990.

34. MAYA, F.; HORSTKOTTE, B.; ESTELA, J.M.; CERDÀ, V. Lab in a syringe: fully automated dispersive liquid-liquid microextraction with integrated spectrophotometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 404, p. 909-917, 2012.

35. MAYA, F.; HORSTKOTTE, B.; ESTELA, J.M.; CERDÀ, V. Automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction - Review. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 59, p. 1-8, 2014.

36. CERDÀ, V.; ESTELA, J.M.; Potential of multisyringe flow-based multicommutated systems. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 600, p. 35-45, 2007.

37. DINIZ, P.H.G.D.; ALMEIDA, L.F.; HARDING, D.P.; ARAÚJO, M.C.U. Flow-batch analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 35, p. 39-49, 2012.

38. ANTHEDIMIS, A.N.; IOANNOU, K.I.G. On-line sequential injection dispersive liquid–liquid microextraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of copper and lead in water samples. **Talanta**, London, v. 79, n. 1, p. 86-91, 2009.

39. ANDRUCH, V.; BALOGH, I.S.; KOCÚROVÁ, L.; ŠANDREJOVÁ, J. Five years of dispersive liquid–liquid microextraction. **Applied Spectroscopy Reviews**, New York, v. 48, n. 3, p. 161-259, 2013.

40. HORSTKOTTE, B.; ALXOVIC, M.; MAYA, F.; DUARTE, C.M.; ANDRUCH, V.; CERDÀ, V. Automatic determination of copper by in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction of its bathocuproine-complex using long path length spectrophotometric detection. **Talanta**, London, v. 99, p. 349-356, 2012.

41. SUÁREZ, R.; HORSTKOTTE, B.; CERDÀ, V. In-syringe magnetic stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for automation and downscaling of methylene blue active substances assay. **Talanta**, London, v. 130, p. 555-560, 2014.

42. GIAKISIKLI, G.; MIRÓ, M.; ANTHEMIDIS, A. Integrated lab-in-syringe platform incorporating a membraneless gas–liquid separator for automatic cold vapor atomic absorption spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 85, p. 8968-8972, 2013.

43. MARTINEZ-JIMENEZ, P.; GALLEGO, M.; VALCÁRCEL, M.; Pre-concentration and determination of trace amounts of lead in water by continuous precipitation in an unsegmented-flow atomic absorption spectrometric system. **Analyst**, London, v. 112, p. 1233-1236, 1987.

44. BATLEY, G.E.; MATOUSEK, J.P.; Determination of heavy metals in sea water by atomic absorption spectrometry after electrodeposition in pyrolitic graphite-coated tubes. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 49, p. 2031-2035, 1977.

45. PACKER, A.P.; GINÉ, M.F.; MIRANDA, C.E.S.; REIS, B.F.; Automated on-line preconcentration of trace determination in water samples by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 12, p. 563-566, 1997.

46. DAPAAH, A.R.K.; TAKANO, N.; AYAME, A. Solvent extration of Pb(II) from acid medium with zinc hexamethylenedithiocarbamate followed by back-extraction and subsequent determination by FAAS. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 386, p. 281-286, 1999.

47. MAHAMOUD, M.E.; OSMAN, M.M.; AMER, M.E. Selective preconcentration and solid phase extraction of mercury(II) from natural water by silica gel-loaded dithizone phases. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 415, p. 33-40, 2000.

48. CARASEK, E.; TONJES, J.W.; SCHARF, M. Pré-concentração de chumbo e cádmio em um sistema de microextração líquido-líquido e determinação por espectrometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 748-752, 2002.

49. ANASTAS, P.T. Green chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Boca Raton, v. 29, p. 167-175, 1999.

50. OLKIEWICZ, M.; CAPORGNO, M.P.; FORTUNY, A.; STÜBER, F.; FABREGAT, A.; FONT, J.; BENGO, C. Direct liquid–liquid extraction of lipid from municipal sewage sludge for biodiesel production. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 128, p. 331-338, 2014.

51. SANCHEZ, M.A.; ROCHA, F.R.P. Liquid–liquid microextraction without phase separation in a multicommuted flow system for diltiazem determination in pharmaceuticals. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 694, n. 1-2, p. 95-99, 2011.

52. ECONOMOU, A. Sequencial injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample handling and pre-treatment. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 24, n. 5, p. 416-425, 2005.

53. PEREIRA, A.C.; ROCHA, F.R.P. A multicommuted flow system with liquid–liquid microextraction for determination of anionic surfactants in freshwaters. **Analytical Methods**, London, v. 5, p. 2104-2109, 2013.

54. PEREIRA, A.C.; ROCHA, F.R.P. Liquid–liquid microextraction in a multicommuted flow system for direct spectrophotometric determination of iodine value in biodiesel. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 829, p. 28-32, 2014.

55. SUAREZ, R.; HORSTKOTTE, B.; DUARTE, C.M.; CERDÀ, V. Fully-automated fluorimetric determination of aluminium in sea water by in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 84, p. 9462-9469, 2012.

56. HENRÍQUEZ, C.; HORSKOTTE, B.; SOLICH, P.; CERDÀ, V. In-syringe magnetic-stirringassisted liquid-liquid microextraction for the spectrophometric determination of Cr(VI) in waters. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 405, p. 6761-6769, 2013.

57. WATANABE, H.; TANAKA, H. A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. **Talanta**, London, v. 52, p. 585-589, 1978.

58. BEZERRA, M.A.; FERREIRA, S.L.C. **Extração em ponto nuvem**: princípios e aplicações em química analítica. Vitória da Conquista: Edições Uesb, 2006.

59. MANIASSO, N. Revisão - Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

60. BEZERRA, M.A.; ARRUDA, M.A.Z.; FERREIRA, S.L.C. Cloud point extraction as a procedure of separation and pre-concentration for metal determination using spectroanalytical techniques: A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**, New York, v. 40, p. 269–299, 2005.

61. STALIKAS, C.D. Micelle-mediated extraction as a tool for separation and preconcentration in metal analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 21, p. 343-355, 2002.

62. PRAMAURO, E.; BIANCO PREVOT, A. Solubilization in micellar systems. Analytical and environmental applications. **Pure & Applied Chemistry**, Oxford, v. 67, n. 4, p. 551-559, 1995.

63. PYTLAKOWSKA, K.; KOZIK, V.; DABIOCH, M. Complex forming organic ligands in cloudpoint extraction of metals ions: A review. **Talanta**, London, v. 110, p. 202-228, 2013. 64. OJEDA, C.B.; ROJAS, F.S. Separation and preconcentration by cloud point extraction procedures for determination of ions: recent trends and applications - Review. **Microchimica Acta**, Heidelberg, v. 177, p. 1-21, 2012.

65. SICILIA, D.; RUBIO, S.; PÉREZ-BENDITO, D. Evaluation of the factors affecting extraction of organic compounds based on the acid-induced phase cloud point approach. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 460, p. 13-22, 2002.

66. SAITOH, T.; TANI, H.; KAMIDATE, T.; WATANABE, H. Phase separation in aqueous micellar solutions of nonionic surfactants for protein separation. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 14, n. 5, p. 213-217, 1995.

67. MATERNA, K.; COTE, G.; SZYMANOWSKI, J. Cloud point of aqueous solutions containing oxyethilated methil dodecanoates: effects of surfactant hydrophilicity, nature of added electrolyte, and water activity. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 269, p. 466-471, 2004.

68. BUSSEROLLES, K.; ROUX-DESGRANGES, G.; ROUX, A.H. Thermodynamic study in aqueous micellar solutions at 298.15 K: comparison of the interactions between ionic surfactants (SDS and CTAB) and 1-alcohols or phenol. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 259, p. 49-56, 1995.

69. SAMADDAR, P.; SEN, K. Cloud point extraction: A sustainable method of elemental preconcentration and speciation – Review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Easton, v. 20, n. 4, p. 1209-1219, 2014.

70. FANG, Z. Flow injection separation and preconcentration. 1. ed. VCH, Weinheim, 1993.

71. FANG, Z.; DONG, L.; XU, S. Critical evaluation of the efficiency and synergistic effects of flow injection techniques for sensitivity enhancement in flame atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 7, p. 293-299, 1992.

72. VEIGA, M.A.M.S.; ROCHA, F.R.P. Unconventional liquid-liquid extraction in undergraduate laboratories: cloud-point separation and preconcentration. **The Chemical Educator**, Meridian, ID, v. 11, p. 187-189, 2006.

73. WEN, X.; LEI, E.; SHI, C.; DENG, Q.; WANG, J.; ZHAO, X. Application of rapid cloud point extraction method for trace cobalt analysis coupled with spectrophotometric determination. **Spectrochimica Acta Part A**, Oxford, v. 115, p. 452-456, 2013.

74. WU, H.; ZHAO, G.; DU, L. Determination of ofloxacin and gatifloxacin by micelle-mediated cloud point extraction-fluorimetry combined methodology. **Spectrochimica Acta Part A**, Oxford, v. 75, n. 5, p. 1624-1628, 2010.

75. ULUSOY, H.I.; AKÇAY, M.; GÜRKAN, R. Development of an inexpensive and sensitive method for the determination of low quantity of arsenic species in water samples by CPE–FAAS. **Talanta**, London, v. 85, n. 3, p. 1585-1591, 2011.

76. KIRAN, K.; KUMAR, K.S.; PRASAD, B.; SUVARDHAN, K.; LEKKALA, R.B.; JANARDHANAM, K. Speciation determination of chromium(III) and (VI) using preconcentration cloud point extraction with flame atomic absorption spectrometry (FAAS). Journal of Hazardous Materials, Amsterdam, v. 150, n. 3, p. 582-586, 2008.

77. CHEN, J.; XIAO, S.; WU, X.; FANG, K.; LIU, W. Determination of lead in water samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry after cloud point extraction. **Talanta**, London, v. 67, n. 5, p. 992-996, 2005.

78. TANI, H. Micelle-mediated extraction. Journal of Chromatography A, Amsterdam, v. 780, p. 229-241, 1997.

79. GU, T.; GALERA-GOMEZ, P.A. Clouding of Triton X-114: the effect of added electrolytes on the cloud point of Triton X-114 in the presence of ionic surfactants. **Colloids and Surfaces** A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 104, p. 307-312, 1995.

80. BARRIONUEVO, W.R.; LANÇAS, F.M. Extração em fase sólida (SPE) e micro-extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.

81. SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. Fundamentos de química analítica. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2006.

82. BERGAMIN FILHO, H.; REIS, B.F.; JACINTHO, A.O.; ZAGATTO, E.A.G. Ion exchange in flow injection analysis: determination of ammonium ions at the μ g L⁻¹ level in natural waters with pulsed Nessler reagent. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 117, n. 6, p. 81-89, 1980.

83. REIS, B.F.; ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G.; COSTA, A.C.S.; KORN, M. Construção de uma cela de fluxo para medidas por espectrofotometria em fase sólida. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p.116-118, 2000.

84. ROCHA, F.R.P.; RAIMUNDO JUNIOR, I.M.; TEIXEIRA, L.S.G. Direct solid-phase optical measurements in flow systems: a review. **Analytical Letters**, New York, v. 44, p. 528–559, 2011.

85. KARLBERG, B.; PACEY, G.E. Flow injection analysis. A practical guide. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989. v. 10.

86. EATON, A.D.; CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A.E. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19. ed. Washington, DC: APHA, 1995.

87. HENRÍQUEZ, C.; HORSTKOTTE, B.; CERDÀ, V. A highly reproducible solenoid micropump system for the analysis of total carbon and ammonium using gas-diffusion with conductimetric detection. **Talanta**, London, v. 118, p. 186-194, 2014.

88. ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F.; BERGAMIN FILHO, H.; KRUG, F.J. Isothermal distillation in flow injection analysis. Determination of total nitrogen in plant material. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 109, p. 45-54, 1979.

89. ATASSANOV, G.T.; LIMA, R.C.; MESQUITA, R.B.R.; RANGEL, A.O.S.S.; TÓTH, I.V. Spectrophotometric determination of carbon dioxide and sulphur dioxide in wines by flow injection. **Analusis**, Paris, v. 28, p. 77-82, 2000.

90. MATOS, I.L.M.; QUEIROZ, R.R.U. Pervaporação: uma técnica de separação contínua não cromatográfica. **Química Nova**, São Carlos, v. 21, n. 2, p. 202-205, 1998.

91. KOMOROWSKA-DURKA, M.; van HOUTEN, R.; STEFANIDIS, G. Application of microwave heating to pervaporation: A case study for separation of ethanol–water mixtures. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, Lausanne, v. 81, p. 35-40, 2014.

92. CHABAY, I. Optical waveguides. Photon plumbing for the chemistry lab: fiber optics, waveguides, and evanescent waves as tools for chemical analysis. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 54, n. 9, p. 1071-1080, 1982.

93. LEI, W.; FUJIWARA, K.; FUWA, K.; Determination of phosphorus in natural waters by long-capillary cell absorption spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 55, p. 951-955, 1983.

94. ZHANG, J. Enhanced sensitivity in flow injection analysis using a long pathlength liquid waveguide capillary flow cell for spectrophotometric detection. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 22, p.57-60, 2006.

95. INFANTE, C.M.C.; ROCHA, F.R.P. A critical evaluation of a long pathlength cell for flowbased spectrophotometric measurements. **Microchemical Journal**, New York, v. 90, p. 19-25, 2008.

96. ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 807-812, 2004.

97. FUWA, K.; LEI, W.; FUJIWARA, K. Colorimetry with a total reflection long capillary cell. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 56, p. 1640-1655, 1984.

98. PASCOA, R.J.N.M.; TÓTH, I.V.; RANGEL, A.O.S.S. Review on recent applications of the liquid waveguide capillary cell in flow based analysis techniques to enhance the sensitivity of spectroscopic detection methods. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 739, p. 1-13, 2012.

99. MELCHERT, W.R.; ROCHA, F.R.P. A greener and highly sensitive flow-based procedure for carbaryl determination exploiting long pathlength spectrophotometry and photochemical waste degradation. **Talanta**, London, v. 81, n. 1–2, p. 327-333, 2010.

100. KOSTAL, V.; ZEIBERGEROVA, M.; SLAIS, K.; KAHLE, V. Fluorescence detection system for capillary separations utilizing a liquid core waveguide with an optical fibre-coupled compact spectrometer. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1081, p. 36-41, 2005.

101. MAK, J.S.W.; RUTLEDGE, S.A.; ABU-GHAZALAH, R.M.; EFTEKHARI, F.; IRIZAR, J.; TAM, N.C.M.; ZHENG, G.; HELMY, A.S. Recent developments in optofluidic-assisted Raman spectroscopy - Review. **Progress in Quantum Electronics**, Amsterdam, v. 37, p. 1-50, 2013.

102. LI, Q.; MORRIS, K.J.; DASGUPTA, P.K.; RAIMUNDO JR., I.; TEMKIN, H. Portable flowinjection analyzer with liquid-core waveguide based fluorescence, luminescence, and long path length absorbance detector. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 479, n. 2, p. 151-165, 2003.

103. EBBS, S.D.; KOSMA, D.K.; NIELSON, E.H.; MACHINGURA, M.; BAKER, A.J.M.; WOODROW, I.E. Nitrogen supply and cyanide concentration influence the enrichment of nitrogen from cyanide in wheat (*Triticum aestivum* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L.). **Plant, Cell and Environment**, Nottingham, v. 33, p. 1152-1160, 2010.

104. MA, J.; DASGUPTA, P.K. Recent developments in cyanide detection: A review. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 673, n. 2, p. 117-125, 2010.

105. ABBASI, S.; VALINEZHAD, R.; KHANI, H. A novel kinetic spectrophotometric method for the determination of ultra trace amount of cyanide. **Spectrochimica Acta Part A**, Oxford, v. 77, p. 112-116, 2010.

106. YARI, A.; SEPAHVAND, R. Highly sensitive carbon paste electrode with silver-filled carbon nanotubes as a sensing element for determination of free cyanide ion in aqueous solutions. **Microchimica Acta**, Heidelberg, v. 174, p. 321-327, 2011.

107. ZACARIAS, C.H. Exposição ocupacional a cianetos – Uma breve revisão. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, São Paulo, v. 2, p. 42-50, 2009.

108. RECALDE-RUIZ, D.L.; ANDRÉS-GARCIA, E.; DÍAZ-GARCIA, M.E. Fluorimetric flow determination and flow-through systems for cyanide control in waste water. **Analyst**, London, v. 125, p. 2100-2105, 2000.

109. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução nº 375/05. **Diário Oficial da União, Poder Executivo**, Brasília, DF, 18 mar. 2005, p. 286. Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi= 459. Acesso em: 6 set. 2014.

110. USEPA. **Cyanide**: Water quality standards criteria summaries: A compilation of state/federal criteria for water. Washington, DC, 1988. (EPA-440/5-88/016).

111. SEBROSKI, J.R.; ODE, R.H. Method comparison and evaluation for the analysis of weak acid-dissociable cyanide. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 31, p. 52-57, 1997.

112. HASSAN, S.S.M.; HAMZA, M.S.A.; KELANY, A.E. A novel spectrophotometric method for batch and flow injection determination of cyanide in electroplating wastewater. **Talanta**, London, v. 71, p. 1088-1095, 2007.

113. LV, J.; ZHANG, Z.; LI, J.; LUO, L. A micro-chemiluminescence determination of cyanide in whole blood. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 148, p. 15-19, 2005.

114. MIRALLES, E.; PRAT, D.; COMPAÑÓ, R.; GRANADOS, M. On-line gas-diffusion separation and fluorimetric detection for the determination of acid disociable cyanide. **Analyst,** London, v. 123, p. 217-220, 1998.

115. KUBAN, V. Gas permeation and preconcentration in the flow-injection determination of acid-available cyanide in waste water. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 259, p. 45-52, 1992.

116. ZACHARIS, C.; TZANAVARAS, P.D.; VOULGAROPOULOS, A.N.; KARLBERG, B. Amperometric determination of cyanides at the low ppb level by automated preconcentration based on gas diffusion coupled to sequential injection analysis. **Talanta**, London, v. 77, p. 1620-1626, 2009.

117. SWEILEH, J.A. Study of equilibria in cyanide systems by gas-diffusion measurement of hydrogen cyanide. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 336, p. 131-140, 1996.

118. THEMELIS, D.G.; KARASTOGIANNI, S.C.; TZANAVARAS, P.D. Selective determination of cyanides by gas diffusion-stopped flow-sequential injection analysis and an on-line standard addition approach. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 632, p. 93-100, 2009.

119. MARION, P.; ROUILLIER, M.C.; BLET, V.; PONS, M.N. On-line monitoring of cyanide concentration via a gas membrane system in extractive metallurgical process. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 238, p. 117-127, 1990.

120. INFANTE, C.M.C.; MASINI, J.C.; ROCHA, F.R.P. A green flow-based procedure for fluorimetric determination of acid-cyanide in natural waters exploiting multicommutation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 391, p. 2931-2936, 2008⁻

121. ANASTAS, P.T.; KIRCHHOFF, M.M. Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry. **Accounts of Chemical Research**, Washington, DC, v. 35, p. 686-694, 2002.

122. MELCHERT, W.R.; REIS, B.F.; ROCHA, F.R.P. Green chemistry and the evolution of flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 714, p. 8-19, 2012.

123. MA, H.; LIU, J. Flow-injection determination of cyanide by detecting an intermediate of the pyridine-barbituric acid chromogenic reaction. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 261, p. 247-252, 1992.

124. MIRALLES, E.; COMPAÑÓ, R.; GRANADOS, M.; PRAT, M.D. Photodissociation/gasdiffusion separation and fluorimetric detection for the analysis of total and labile cyanide in a flow system. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 365, p. 516-520, 1999.

125. WEINBERH, H.S.; COOK, S.J. Segmented flow injection, UV digestion, and amperometric detection for the determination of total cyanide in wastewater treatment plant effluents. **Analytical Chemistry,** Washington, DC, v. 74, p. 6055-6063, 2002.

126. HAJ-HUSSEIN, A. Flow injection spectrophotometric determination of cyanide by the phenolphthalein method. **Talanta**, London, v. 44, p. 545-551, 1997.

127. MA, J.; DASGUPTA, P.K.; BLACKLEDGE, W.; BOSS, G.R. Cobinamide-based cyanide analysis by multiwavelength spectrometry in a liquid core waveguide. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 82, p. 6244-6250, 2010.

128. MA, J.; DASGUPTA, P.K.; ZELDER, F.H.; BOSS, G.R. Cobinamide chemistries for photometric cyanide determination. A merging zone liquid core waveguide cyanide analyzer using cyanoaquacobinamide. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 736, p. 78, 2012.

129. IKEBUKURO, K.; SHIMOMURA, M.; ONUMA, N.; WATANABE, A.; NOMURA, Y.; NAKANISHI, K.; ARIKAWA, Y.; KARUBE, I. A novel biosensor system for cyanide based on a chemiluminescence reaction. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 329, p. 111-116, 1996.

130. LU, J.; QIN, W.; ZHANG, Z.; FENG, M.; WANG, Y. A flow-injection type chemiluminescence-based sensor for cyanide. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 304, p. 369-373, 1995.

131. IKEBUKURO, K.; MIYATA, A.; CHO, S.J.; NOMURA, Y.; CHANG, S.M.; YAMAUCHI, Y.; HASEBE, Y.; UCHIYAMA, S.; KARUBE, I. Microbial cyanide sensor for monitoring river water. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 48, p. 73-80, 1996.

132. ALIZADEH, N.; TEYMOURIAN, H.; AGHAMOHAMMADI, M.; MEGHDADI, S.; AMIRNASR, M. Highly Selective Cyanide coated-wire electrode based on a recently synthesized Co(II) complex with the N,N'-bis(2-quinolinecarboxamido)-1,2-benzene applying batch and flow injection analysis techniques. **IEEE Sensors Journal**, New York, v. 7, p. 1727-1734, 2007.

133. TIMOFEYENKO, Y.G.; ROSENTRETER, J.J.; MAYO, S. Piezoelectric quartz crystal microbalance sensor for trace aqueous cyanide ion determination. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 79, p. 251-255, 2007.

134. CHRISTISON, T.T.; ROHRER, J.S. Direct determination of free cyanide in drinking water by ion chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1155, p. 31–39, 2007.

135. FAGAN, P.A.; HADDAD, P.R. Determination of free cyanide in gold cyanidation process liquors by ion-interaction chromatography with post-column derivatization. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 550, p. 559-571, 1991.

136. LU, Q.; COLLINS, G.E.; EVANS, T.; HAMMOD, M.; WANG, J.; MULCHANDANI, A. Vapor and liquid phase detection of cyanide on a microchip. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 25, p. 116–122, 2004.

137. MARTÍ, V.; AGUILAR, M.; YEUNG, E. Indirect fluorescence detection of free cyanide and related compounds by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 709, p. 367-374, 1995.

138. FORTES, P.R.; FERES, M.A.; SASAKI, M.K.; ALVES, E.R.; ZAGATTO, E.A.G.; PRIOR, J.A.V.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. Evidences of turbulent mixing in multi-pumping flow systems. **Talanta,** London, v. 79, p. 978-983, 2009.

139. MENDHAM, J.; DENNEY, R.C.; BARNES, J.D.; THOMAS, M.J.K. Vogel's quantitative chemical analysis. 6. ed. Essex: Prentice Hall, 2000.

140. MOYA, H.D.; DANTONI, P.; ROCHA, F.R.P.; COICHEV, N. A multicommuted flow-system for spectrophotometric determination of tannin exploiting the Cu(I)/BCA complex formation. **Microchemical Journal**, New York, v. 88, p. 21-25, 2008.

141. SILVA, M.S.P.; MASINI, J.C. Acoplamento de cela de difusão gasosa a sistema de análise por injeção sequencial visando a determinação espectrofotométrica de sulfeto. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 545-549, 2004.

142. ROCHA, D.L.; ROCHA, F.R.P. A flow-based procedure with solenoid micro-pumps for the spectrophotometric determination of uric acid in urine. **Microchemical Journal**, New York, v. 94, p. 53-59, 2010.

143. NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; HOSSEINI, S.N. Flow injection analysis– flame atomic absorption spectrometry system for indirect determination of cyanide using cadmium carbonate as a new solid-phase reactor. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 528, p. 269-273, 2005. 144. DADFARNIA, S.; SHABANI, A.M.H.; TAMADON, F.; REZAEI, M. Indirect determination of free cyanide in water and industrial waste water by flow injection-atomic absorption spectrometry. **Microchimica Acta**, Heidelberg, v. 158, p. 159-163, 2007.

145. ROCHA, D.L.; BATISTA, A.D.; ROCHA, F.R.P.; DONATI, G.L.; NÓBREGA, J.A. Greening sample preparation in inorganic analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 45, p. 79-92, 2013.

146. LAESPADA, M.E.F.; PAVÓN, J.L.P.; CORDERO, B.M. Micelle-mediated methodology for the preconcentration of uranium prior to its determination by flow injection. **Analyst**, London, v. 118, p. 209-212, 1993.

147. SILVA, M.A.M.; FRESCURA, V.L.A.; CURTIUS, A.J. Determination of trace elements in water samples by ultrasonic nebulization inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction. **Spectrochimica Acta Part B**, Oxford, v. 55, n. 7, p. 803-813, 2000.

148. GIOKAS, D.L.; PALEOLOGOS, E.K.; TZOUWARA-KARAYANNI, S.M.; KARAYANNIS, M.I. Single-sample cloud point determination of iron, cobalt and nickel by flow injection analysis flame atomic absorption spectrometry—application to real samples and certified reference materials. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, London, v. 16, p. 521-526, 2001.

149. PALEOLOGOS, E.K.; STALIKAS, C.D.; TZOUWARA-KARAYANNI, S.M.; KARAYANNIS, M.I. Selective speciation of trace chromium through micelle-mediated preconcentration, coupled with micellar flow injection analysis–spectrofluorimetry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 436, p. 49-57, 2001.

150. GIOKAS, D.L.; PALEOLOGOS, E.K.; KARAYANNIS, M.I. Speciation of Fe(II) and Fe(III) by the modified ferrozine method, FIA-spectrophotometry, and flame AAS after cloud-point extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 373, p. 237-243, 2002.

151. WUILLOUD, J.C.A.; WUILLOUD, R.G.; SILVA, M.F.; OLSINA, R.; MARTINEZ, L.D. Sensitive determination of mercury in tap water by cloud point extraction pre-concentration and flow injection-cold vapor-inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 365-374, 2002.

152. FANG, Q.; DU, M.; HUIE, C.W. On-Line incorporation of cloud point extraction to flow injection analysis. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 73, n. 14, p. 3502-3505, 2001.

153. PALEOLOGOS, E.K.; VLESSIDIS, A.G.; KARAYANNIS, M.I.; EVMIRIDIS, N.P. On-line sorption preconcentration of metals based on mixed micelle cloud point extraction prior to their determination with micellar chemiluminescence. Application to the determination of chromium at ng L⁻¹ levels. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 477, p. 223-231, 2003.

154. GARRIDO, M.; DI NEZIO, M.S.; LISTA, A.G.; PALOMEQUE, M.; FERNÁNDEZ BAND, B.S. Cloud-point extraction/preconcentration on-line flow injection method for mercury determination. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 502, p. 173-177, 2004.

155. LI, Y.; HU, B.; JIANG, Z. On-line cloud point extraction combined with electrothermal vaporization inductively coupled plasma atomic emission spectrometry for the speciation of inorganic antimony in environmental and biological samples. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 576, p. 207-214, 2006.

156. DALALI, N.; JAVADI, N.; KUMAR AGRAWAL, Y. On-line incorporation of cloud point extraction on flame atomic absorption spectrometric determination of silver. **Turkish Journal of Chemistry**, Ankara, v. 32, p. 561-570, 2008.

157. LEMOS, V.A.; BALIZA, P.X.; CARVALHO, A.L.; OLIVEIRA, R.V.; TEIXEIRA, L.S.G.; BEZERRA, M.A. Development of a new sequential injection in-line cloud point extraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of manganese in food samples. **Talanta**, London, v. 77, p. 388-393, 2008.

158. LEMOS, V.A.; DAVID, G.T. An on-line cloud point extraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of trace manganese in food samples. **Microchemical Journal**, New York, v. 94, p. 42-47, 2010.

159. KARA, D. Preconcentration and determination of trace metals by flow injection micellemediated extraction using flame atomic absorption spectrometry. **Talanta,** London, v. 79, p. 429-435, 2009. 160. GIL, R.A.; GÁSQUEZ, J.A.; OLSINA, R.; MARTINEZ, L.D.; CERUTTI, S. Cloud point extraction for cobalt preconcentration with on-line phase separation in a knotted reactor followed by ETAAS determination in drinking waters. **Talanta**, London, v. 76, p. 669-673, 2008.

161. NAN, J.; JIANG, Y.; YAN, X. A flow injection micelle-mediated preconcentration and separation procedure without phase separation coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry for determination of trace lead in biological samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 18, p. 946-950, 2003.

162. ORTEGA, C.; CERUTTI, S.; OLSINA, R.A.; SILVA, M.F.; MARTINEZ, L.D. On-line complexation/cloud point preconcentration for the sensitive determination of dysprosium in urine by flow injection inductively coupled plasma–optical emission spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 375, p. 270-274, 2003.

163. ORTEGA, C.; GOMEZ, M.R.; OLSINA, R.A.; SILVA, M.F.; MARTINEZ, L.D. On-line cloud point preconcentration and determination of gadolinium in urine using flow injection. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 17, p. 530-533, 2002.

164. LI, C.F.; WONG, J.W.C.; HUIE, C.W.; CHOI, M.M.F. On-line injection-cloud point preconcentration of polycyckic aromatic hydrocarbons coupled with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1214, p. 11-16, 2008.

165. LU, C.; SONG, G.; LIN, J.M.; HUIE, C.W. Enhancement in sample preconcentration by the on-line incorporation of cloud point extraction to flow injection analysis inside the chemiluminescence cell and the determination of total serum bilirubin. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 590, p. 159-165, 2007.

166. SOMBRA, L.; LUCONI, M.; SILVA, M.F.; OLSINA, R.A.; FERNANDEZ, L. Spectrophotometric determination of trace aluminium content in parenteral solutions by combined cloud point preconcentration–flow injection analysis. **Analyst,** London, v. 126, p. 1172–1176, 2001.

167. ROCHA, F.R.P.; NÓBREGA, J.A. Efeito Schlieren em sistemas de análise por injeção em fluxo. **Química Nova,** São Paulo, v. 19, n. 6, p. 636-640, 1996.

168. ORERA, I.; ORDUNA, J.; ABADIA, J.A.; ALAVREZ-FERNANDEZ, A. Electrospray ionization collision-induced dissociation mass spectrometry: a tool to characterize synthetic polyaminocarboxylate ferric chelates used as fertilizers. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 24, p. 109-119, 2010.

169. SINHÁ, L.S.; SAXENA, R. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and nonenzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant Bacopa monnieri. **Chemosphere**, Oxford, v. 62, p. 1340–1350, 2006.

170. OLIVEIRA, S.G.S.; ROCHA, F.R.P. A green analytical procedure for determination of copper and iron in plant materials after cloud point extraction. Journal of Brazilian Chemistry Society, São Paulo, v. 21, p. 234-239, 2010.

171. FERREIRA, S.L.C.; NANO, R.M.W. Use of 1-(2-thiazolylazo) 2-naphthol in rapid determination of iron in geological matrices. **Talanta**, London, v. 41, p. 1937-1941, 1994.

172. LUCCAS, P.O.; KRUSCHE, A.V.; NÓBREGA, J.A.; MOZETO, A.A. Aplicação de uma reação de neutralização como fonte de calor em sistema de injeção em fluxo. **Química Nova,** São Paulo, v. 18, p. 259-261, 1995.

173. DIAS, A.C.B.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C.; QUINTELLA, C.M.; LIMA, A.M.V. Lima; ZAGATTO, E.A.G. A critical comparison of analytical flow systems exploiting streamlined and pulsed flows. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 388, p. 1303, 2007.

174. GASPAR, A.; POSTA, J. On-line sorption preconcentration od chromium(VI) and its determination by flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 354, p. 151-158, 1997.

175. SONG, Q.G.; LU, C.; KAYAKAWA, K. Comparison of traditional cloud-point extraction and on-line flow-injection cloud-point extraction with a chemiluminescence method using benzo[a]pyrene as a marker. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 384, p. 1007-1012, 2006.

176. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. **Ficha de informação toxicológica**. Antimônio. São Paulo, 2014. Disponível em: <<u>http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/antimonio.pdf</u>]>. Acesso em: 26 ago. 2014.

177.WIKIPEDIA.Antimônio.Disponívelem:<http://pt.wikipedia.org/wiki/Antim%C3%B4nio>. Acesso em: 26 ago. 2014.

178. RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESÚS, M.N.; MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova,** São Paulo, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

179. BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de segurança epidemiológica.** 5. ed. Brasília, DF, 2002. p. 504. v. 2. Influenza e varíola. Disponível em: <<u>http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/guia vig epi vol ll.pdf</u>.> Acesso em: 6 out. 2014.

180. FERREIRA, S.L.C.; SANTOS, W.N.L.; SANTOS, I.F.; JUNIOR, M.M.S.; SILVA, L.O.B.; BARBOSA, U.A.; SANTANA, F.A.; QUEIROZ, A.F.S. Strategies of sample preparation for speciation analysis of inorganic antimony using hydride generation atomic spectrometry - Review. **Microchemical Journal**, New York, v. 114, p. 22-31, 2014.

181. SAMADI-MAYBODI, A.; REZAEI, V. A cloud point extraction for spectrophotometric determination of ultra-trace antimony without chelating agent in environmental and biological samples. **Microchimica Acta**, Heidelberg, v. 178, p. 399-404, 2012.

182. BOEX, T.J; PADGHAM, C.; NURSE, P.A.; PLATT, C.C.; COX, P.; WIGGLESWORTH, J.S. Antimony and sudden infant death syndrome. **The Lancet**, London, v. 351, p. 1102-1103, 1998.

183.USEPA.Drinking water contaminants.National primary drinking waterregulations.Washington,DC,2009.Disponívelem:<http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm#two>.Acesso em: 6 out. 2014.

184. WHO. **Guidelines for drinking-water quality**. First addendum to third edition. v. 1. Recommendations. Geneva, 2006. p. 304. Disponível em: http://www.who.int/water-sanitation-health/dwq/gdwq0506.pdf> Acesso em: 7 jul. 2014.

185. SEMENOVA, N.V.; LEAL, L.O.; FORTEZA, R.; CERDÀ, V. Antimony determination and speciation by multisyringe flow injection analysis with hydride generation-atomic fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 530, p. 113-120, 2005.

186. MIRAVET, R.; LÓPEZ-SÁNCHES, J.F.; RUBIO, R. New considerations about the separation and quantification of antimony species by ion chromatography–hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1052, p. 121-129, 2004.

187. HARING, B.J.A.; VAN DELFT, W.; BOM, C.M. Determination of arsenic and antimony in water and soil by hydride generation and atomic absorption sprectroscopy. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v 310, p. 217-223, 1982.

188. FAN, Z. Speciation analysis of antimony (III) and antimony (V) by flame atomic absorption spectrometry after separation/preconcentration with cloud point extraction. **Microchimica Acta**, Heidelberg, v. 152, p. 29-33, 2005.

189. SERAFIMOVSKA, J.M.; ARPADJAN, S.; STAFILOV, T. Speciation of dissolved inorganic antimony in natural waters using liquid phase semi-microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, New York, v. 99, p. 46-50, 2011.

190. SOUZA, J.M.O.; TARLEY, C.R.T. Preconcentration and speciation of Sb(III) and Sb(V) in water samples and blood serum after cloud point extraction using chemometric tools for optimization. **Analytical Letters**, New York, v. 41, p. 2465-2486, 2008.

191. SANTOS, V.S.; SANTOS, W.J.R.; KUBOTA, L.T.; TARLEY, C.R.T. Speciation of Sb(III) and Sb(V) in meglumine antimoniate pharmaceutical formulations by PSA using carbon nanotube electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 151-157, 2009.

192. KHOO, S.B.; ZHU, J. Poly(pyrogallol) film on glassy carbon electrode for selective preconcentration and stripping voltammetric determination of Sb(III). **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 373, p. 15-27, 1998.

193. SUN, Y.C.; YANG, J.Y. Simultaneous determination of arsenic(III,V), selenium(IV,VI), and antimony(III,V) in natural water by coprecipitation and neutron activation analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 395, n. 3, p. 293-300, 1999.

194. TRIVELIN, L.A.; ROHWEDDER, J.J.R.; RATH, S. Determination of pentavalent antimony in antileishmaniotic drugs using an automated system for liquid–liquid extraction with on-line detection. **Talanta**, London, v. 68, 1536-1543, 2006.

195. LI, Y.; HU, B.; MAN, E.; XIANG, G. Simultaneous speciation of inorganic selenium and antimony in water samples by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry following selective cloud point extraction. **Water Research**, New York, v. 42, p. 1195-1203, 2008.

196. JIANG, X.; WEN, S.; XIANG, G. Cloud point extraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for the speciation of antimony(III) and antimony(V) in food packaging materials. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 175, p. 146-150, 2010.

197. ABBASPOUR, A.; NAJAFI, M.; KAMYABI, M.A. Quantitative kinetic determination of Sb(V) and Sb(III) by spectrophotometric H-point standard addition method. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 505, n. 2, p. 301-305, 2004.

198. GÓMEZ GONZALES, M.J.; RENEDO, O.D.; MARTÍNEZ, M.J. Simultaneous determination of antimony(III) and antimony(V) by UV–vis spectroscopy and partial least squares method (PLS). **Talanta,** London, v. 68, n. 1, p. 67-71, 2005.

199. ALMEIDA, V.G.K.; LIMA, M.F.; CASSELLA, R.J. Development of a reversed FIA system for the spectrophotometric determination of Sb(III) and total Sb in antileishmanial drugs. **Talanta,** London, v. 71, p. 1047-1053, 2007.

200. MADRAKIAN, T.; BOZORGZADEH, E. Spectrophotometric determination of Sb(III) and Sb(V) in biological samples after micelle-mediated extraction. Journal of Hazardous Materials, Amsterdam, v. 170, p. 809-813, 2009.

201. FERREIRA, S.L.C.; BRUNS, R.E.; FERREIRA, H.S.; MATOS, G.D.; DAVID, J.M.; BRANDÃO, G.C.; SILVA, E.G.P.; PORTUGAL, L.A.; REIS, P.S.; SOUZA, A.S.; SANTOS, W.N.L. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 597, p. 179-186, 2007.

202. PERKIN ELMER. Recommended analytical conditions and general information for flow injection mercury/hydride analysis using PerkinElmer FIAS – 100/400. Waltham, MA, 2002.

203. DENG, T.L.; CHEN, Y.; BELZILE, N. Antimony speciation at ultra trace levels using hydride generation atomic fluorescence spectrometry and 8-hydroxyquinoline as an efficient masking agent. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 432, p. 293-302, 2001.

204. WELZ, B.; SUCMANOVÁ, M. L-cysteine as a reducing and releasing agent for the determination of antimony and arsenic using flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry —Part 1. Optimization of the analytical parameters. **Analyst**, London, v. 118, p. 1417-1423, 1993.

205. PALEOLOGOS, E.K.; GIOKAS, D.L.; KARAYANNIS, M.I. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 24, n. 5, p. 426-436, 2005.

206. FRIZZARIN, R.M.; ROCHA, F.R.P. An improved approach for flow-based cloud point extraction. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 820, p. 69-75, 2014.

207. LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTROM, A.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 42, p. 3-40, 1998.

208. NÓBREGA, J.A.; ROCHA, F.R.P. Ionic strength effect on the rate of reduction of hexacyanoferrate(III) by ascorbic acid. A flow injection kinetic experiment. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 74, p. 560-562, 1997.